Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor Prof. Dr. H. E. Bock

Agarelektrophoretische und immunologische Untersuchungen des tryptophanreichen Praealbumin im Serum

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Christel Schöttler
aus Berlin

Tübingen 1963

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

7532

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Dekan: Professor Dr. Dr. E. Fröhlich

Berichterstatter: Prof. Dr. H.E. Bock

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Elektrophoretische Untersuchungen	2
A. Angewandte Methoden	2
B. Untersuchungen zur Methode	4
a) Kontrolle des Photometers	4
b) Eigenschaften der Amidoschwarz 10B Farblösung	4
c) Anfärbbarkeitsbedingungen für Standardstreifen	5
d) Einfluß der Lagerungszeit auf die Extinktion gefärbter Streifen	8
C. Quantitative elektrophoretische Bestimmung der Praealbuminkonzentration im Serum	10
a) Berechnung und Eichkurve	10
b) Normalwerte	12
c) Cyclusabhängigkeit	13
D. Einflüsse von Temperatur und Lagerung auf die Praealbumingröße	16
Immunologische Untersuchungen	22
A. Einführung und Problemstellung	22
a) Quantitative immunologische Methode der PA-Bestimmung im Serum	23
B. Methodische Voruntersuchungen	27
a) Transferrinbestimmung im Serum	27
b) Einfluß des Serumbilirubins auf die quantitative PA-Bestimmung	29
C. Quantitative immunologische Bestimmung der PA-Konzentration von	
a) Normalseren	43
b) Hepatitisseren	45
c) Mischseren	47
d) gealterten Seren	48
D. Immunelektrophoretische Untersuchungen	50
Diskussion	55
Zusammenfassung	61
Literatur	64

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547602_0012

Einleitung:

Bei elektrophoretischen Untersuchungen des Liquor cerebrospinalis wurde eine im elektrischen Feld vor dem Albumin wandernde Fraktion beobachtet[20)26)27)31)33)43)48)], die von ALY[1)] aus Liquor cerebrospinalis und von SCHULTZE u.Mitarb.[51)] aus Serum isoliert wurde. Die aus Serum und Liquor cerebrospinalis isolierten Fraktionen waren identisch. Zuerst beobachteten HOCH und CHANUTIN[32)] zwei kleine Vorkomponenten im Serum. Anderen Autoren gelang es entweder nach Konzentration des Serums mit der Papierelektrophorese[39)40)41)] oder mittels praeparativer Elektrophoresemethoden[15)25)36)49)] oder Immunelektrophorese[23)46)], eine Vorfraktion im Serum nachzuweisen.

1956 konnten SCHULTZE u.Mitarb.[51)] eine vor dem Albumin wandernde eiweißhaltige, fettfreie, zuckerarme und albuminähnliche Fraktion isolieren, die wegen des hohen Tryptophangehaltes von SCHULTZE als tryptophanreiches Praealbumin (= PA) bezeichnet wurde. Dieses tryptophanreiche PA ist mit dem von GRABAR als α_1 bezeichnetem Protein immunologisch identisch und entspricht der von ALY[2)3)4)5)6)7)] elektrophoretisch untersuchten Fraktion.
Nachdem SCHULTZE und SCHWICK 1959 eine quantitative immunologische Bestimmungsmethode für Proteine[53)] beschrieben haben, war die Möglichkeit zu einer quantitativen immunologischen Kontrolle der elektrophoretisch bestimmten PA-Werte gegeben.

Diese Überprüfung erschien besonders wichtig, weil es methodisch schwierig ist, eine kleine Eiweißfraktion elektrophoretisch genau zu bestimmen. Die elektrophoretische Beweglichkeit einer Eiweißfraktion genügt auch nicht zur Charakterisierung einer Proteinfraktion, da sie aus immunologisch verschiedenen Proteinindividuen zusammengesetzt sein kann.

Neben einem Vergleich der elektrophoretisch und immunologisch bestimmten PA-Werte von Normalseren waren von besonderem Interesse Untersuchungen von Seren mit PA-Verminderung (z.B. Hepatitisseren) sowie von gealterten Seren, bei denen sich Albumin-Vorläufer zeigten. In der vorliegenden Arbeit wurde den immunologischen Versuchen eine kritische Prüfung der agarelektrophoretischen Methode vorausgeschickt.

Elektrophoretische Untersuchungen.

A. Angewandte Methoden.

1. Agarelektrophorese:

Es wurde mit der horizontalen Zonenelektrophorese auf Agar-Agar in der feuchten Kammer[57] gearbeitet, in der Ausführung, die schon in früheren Untersuchungen angewandt wurde[7)47)56)].

Zur Zubereitung des Agars wurden 2,5 g Dan-Agar in 200 ml Aqua dest. 5 Minuten in einem Rundkolben mit Rücklaufkühler gekocht und nach Zugabe von 200 ml Michaelispuffer (pH 8,6) nochmals erhitzt. Der Agar wurde heiß in eine 40 x 43 cm große Glaswanne gegossen. Nach dem Erkalten ließen sich 18 Glasstreifen (4 cm x 21 cm x 1,5 mm) genau waagerecht auflegen. Diese Glasstreifen wurden mit der gleichen Menge "Rein-Agar-Behringwerke" nochmals blasenfrei und gleichmäßig übergossen. Zum Schutz gegen Verdunstung wurde dann ein Kammerdeckel mit einem angefeuchteten Filterpapierbelag aufgelegt und die ganze Kammer mindestens 4 Stunden bei 4°C aufbewahrt. Danach konnten die Agarplatten mit den Glasstreifen ausgeschnitten werden. Um für die aufzutragende Serummenge genügend Raum zu schaffen, wurde 5 cm vom negativen Pol entfernt mittels kleiner Filterpapierstreifen (0,5 x 6 x 36 mm) aus "Schleicher-Schüll" 2043b Mgl-Papier eine flache querverlaufende Rinne gesaugt und 0,07 ml Serum mit einer Blutzuckerpipette aufgetragen. Innerhalb von 15 Minuten zog das Serum vollständig ein. Die Elektrophoreseeinrichtung entsprach bis auf geringe Änderungen den üblichen Apparaturen. Die gesamte Apparatur stand während des Versuches unter einem isolierenden Kasten, um die Verdunstung möglichst konstant zu halten. Nach 8-stündiger Laufzeit bei 2,5 V/cm wurden das leicht zu erkennende Albumin samt den Globulinen verworfen und die PA enthaltenden Agarteile in 4%iger Essigsäure 4 Stunden fixiert, mit Filterpapier bedeckt und getrocknet.

Färbung:

18 trockene Agarstreifen und 3 halbe Standardstreifen (Herstellung des Standardstreifens s.S. 5) wurden in 3 Liter Farblösung 5 Stunden zusammen gefärbt.

Farblösung: 0,6% Amidoschwarz 10B
5,0% Sublimat
2,0% Eisessig

Die Entfärbung erfolgte in 2%iger Essigsäure, unter dreimaligem Schütteln pro Minute, und dauerte genau 5 Minuten.

Auswertung:

Die gefärbten Agarstreifen wurden im Elko-Direktschreiber (Zeiss) bei Filter 54 photometriert, indem man den Streifen einmal von rechts und einmal von links auswertete, um die gefärbte Fraktion in ihrer ganzen Höhe zu erfassen; ein Verfahren[24], das sich zur Erhöhung der Genauigkeit der Auswertung empfiehlt. Die in das Diagramm eingezeichneten Gauss'schen Verteilungskurven wurden planimetriert.

2. Papierelektrophorese:

Von allen untersuchten Seren wurden nach der von GRASSMANN und HANNIG angegebenen Methode[26] Papierelektrophoresen angefertigt. Die Auswertung der mit Amidoschwarz 10B gefärbten Streifen erfolgte ebenfalls im Elko-Direktschreiber (Filter 54).

3. Gesamteiweißbestimmung:

Der Eiweißgehalt der Seren und Eiweißlösungen wurde mittels des Biuretreagenzes, das nach Angaben von EGGSTEIN[17] angesetzt wurde, bestimmt.

4. Statistische Berechnung:

Die in den statistischen Berechnungen verwandten Formeln und Bezeichnungen sind den wissenschaftlichen Tabellen von GEIGY[16] entnommen.

B. Untersuchungen zur Methode.

a) Kontrolle des Photometers.

Das Photometer wurde durch den Werkskundendienst der Firma Zeiss in gewissen Abständen kontrolliert und auf unsere Veranlassung mit einem Meßkeil nachgemessen. Die dabei geprüften absoluten Extinktionen zeigten Schwankungen, die unter 5% des Wertes lagen, der bei Auslieferung des Gerätes angegeben worden war. Ein zwischenzeitlich eingebauter neuer Meßkeil hatte die gleichen Kriterien wie der alte Meßkeil. Grobe Schwankungen, die in kürzeren Zeitabständen auftraten, z.B. Stromschwankungen oder momentane technische Störungen, waren durch einen Standardstreifen zu erfassen, der sich über eine Zeit von mindestens 14 Tagen als ausreichend konstant zur Kontrolle der Apparateschwankungen erwies. Der auf S. 9 beschriebene Abfall der Farbintensität der gefärbten Proteinfraktionen zeigte sich erst nach einem längeren Beobachtungszeitraum.

b) Eigenschaften der Amidoschwarz 10B Farblösung, geprüft an einigen Standardstreifen.

1. Das Verhalten der Extinktion:

Zur Kontrolle der Farbkonzentration wurden über 4 Farbansätze hinweg nach jeder Färbung Extinktionsmessungen im Elko I bei Filter S57, Schichtdicke 1 cm, durchgeführt. Die gemessenen absoluten Extinktionen (Ext. x $2{,}5 \times 10^2$) sind in Abb. 1 eingetragen. Bei ihrer Betrachtung fallen die Schwankungen der Extinktionen bei der Farblösung I auf. Der anfängliche Anstieg und die erst dann erfolgende Einstellung auf einen konstanten Wert hängt offenbar mit dem sofortigen Gebrauch der Farblösung zusammen. Neue Farblösungen wurden deshalb mindestens 2 Wochen vor Gebrauch angesetzt und zwischen den Färbungen in einem luftdicht abgeschlossenen Gefäß aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen hielt sich die Extinktion der Farbe über mindestens 30 Färbungen konstant.

2. Die Änderung des pH der Farblösung:

PH-Messungen der Farblösung wurden mit dem pH-Meter (Methrom) vor Gebrauch der Farbe, während und nach jeder Färbung durchgeführt. Messungen der 1.Farblösung ergaben vor der 1.Färbung ein pH von 2,44 und nach der 10-Färbung ein pH von 2,54. Diese Änderungen des pH hängen vermutlich mit Spuren von Veronalpuffer zusammen, die mit den Elektrophoresestreifen in die Farbe gelangen. Eine Veränderung der Farbeigenschaften durch diese geringe pH-Änderung erscheint unwahrscheinlich.

c) Anfärbbarkeitsbedingungen für Standardstreifen.

1. Herstellung der Standardstreifen:

Bei der Herstellung der sogenannten "s t a t i o n ä r e n S t a n d a r d s t r e i f e n" wurde eine bestimmte Proteinmenge in 0,9% NaCl gelöst und 4 mal im Abstand von 4 cm auf Agarstreifen nach der in Kapitel A.1 angegebenen Methode aufgetragen. Die Streifen wurden 8 Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur aufbewahrt und nach Halbierung wie üblich gefärbt und ausgewertet.
Bei den "g e l a u f e n e n S t a n d a r d s t r e i f e n" wurden die Proteintestlösungen vor der Anfärbung einer Elektrophorese unter Standardbedingungen (s.S.2) unterworfen. Der Eiweißgehalt der ausgewogenen Proteinlösungen wurde mittels der Biuretreaktion geprüft. Die Abweichung der Einwaage vom Biuretwert schwankte zwischen $\pm$ 6%. Die Testproteine wurden im Vacuum über Silicagel bei 4°C aufbewahrt.

2. Kontrolle der Färbebedingungen mit Albuminstandardstreifen:

Die Kontrolle der Anfärbbarkeitsbedingungen wurde mit Albuminstandardstreifen durchgeführt (Auftragmenge: 0,05 ml einer 80 mg% Albuminlösung = 0,04 mg Albumin). Geprüft wurden 4 verschiedene Farblösungen und 3 Agarchargen. Um die Färbebedingungen konstant zu halten, wurden grundsätzlich jeweils 4 bis 6 Standardstreifen

und 15 bis 17 Routineuntersuchungen = 21 Elektrophoresestreifen zusammen gefärbt. Als Farbkontrolle wurden die Mittelwerte der Planimeterwerte von 4 bis 6 Albuminstandardstreifen angesehen.
In der Tabelle 1 sind die Mittelwerte (MW) und die Streuung der Farbkontrollen in Planimetereinheiten (PLEH) für jede Proteinlösung, Agarcharge und jeden Farbansatz aufgeführt.

Tabelle 1.

Proteinlösung	Agarcharge	Farblösung	Anzahl der Färbungen	MW der PLEH	± S	± 2 $S_{\bar{x}}$
A	34	I	13	105,9	4,76	2,64
B	34	II	17	101,3	2,16	1,04
C	39	II	8	100,3	3,70	2,61
D	39	III	18	98,3	4,3o	2,02
E	26	III	2	108,0	-	-
F	26	IV	7	119,5	4,09	3,10

Es zeigt sich, daß die Farblösungen I und IV höhere Werte der Farbkontrollen ergeben als die der Farblösungen II und III. Die Unterschiede zwischen Gruppe A und B sind nicht agarbedingt. Beim Vergleich der Gruppen B/C/D und E/F wird aber doch sichtbar, daß nicht nur die Farblösung, sondern auch die Agarcharge die Anfärbbarkeit des Proteins beeinflussen kann. Der Einfluß von Farbe und Agareigenschaften ist deshalb bei quantitativen Messungen zu berücksichtigen. Die Kontrolle der Färbungen ergibt weiterhin, daß die von uns benutzte Amidoschwarz-Farbe bis zu 30 mal ohne Beeinträchtigung der Färbeeigenschaften benutzt werden kann, soweit folgende Färbebedingungen streng eingehalten werden:

a) Farbe mindestens 2 Wochen vor Gebrauch ansetzen
b) Immer die gleiche Anzahl von Streifen gleichzeitig färben
c) Konstanz der Färbe- und Entfärbebedingungen
d) Kontrolluntersuchungen für jede neue Agarcharge und Farblösung

Farbuntersuchungen von NIEMANN[44] mit einer Amidoschwarz-Trichloressigsäurefarbe weisen zusätzlich auf eine Abhängigkeit der Proteinfärbbarkeit von der Art des verwandten Fällungsmittels hin.

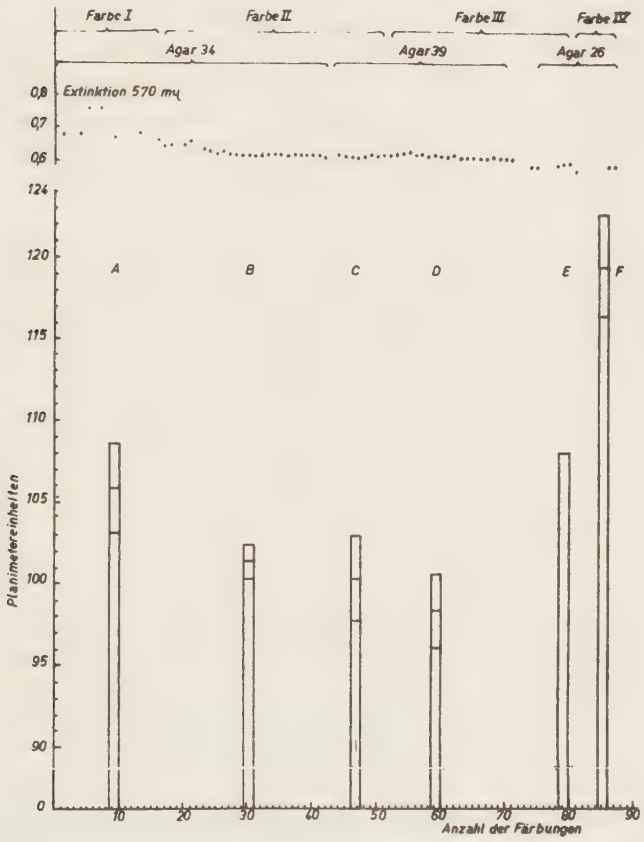


Abb. 1. Graphische Darstellung der Mittelwerte + 2 S der Planimetereinheiten der Farbkontrollen. Versuchsgruppen A bis F. Die dazugehörigen statistischen Parameter sind in Tab. 1 aufgeführt. Bei Abweichung des Biuretwertes von der Einwaage wurden die Planimetereinheiten auf den Biuretwert umgerechnet. Bei E wurde auf eine statistische Ausrechnung verzichtet.

3. Vergleich von stationären und gelaufenen Standardstreifen:

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Anfärbbarkeitsbedingungen für stationäre und gelaufene Streifen überprüft. Die Eiweißkonzentration der Testlösung wurde entsprechend dem zu erwartenden Normalwert des Serum-PA gewählt. Testlösung: 0,07 ml einer 40 mg% Albuminlösung und einer 40 mg% PA-Lösung (0,028 mg Protein).
Der Versuch wurde mit 5 verschiedenen Albumin- und PA-Testlösungen, 3 Agarchargen und 3 Farblösungen durchgeführt. Die Standardstreifen wurden über mehrere Färbungen verteilt. Die Mittelwerte der gefundenen Planimetereinheiten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2.

Nr.	Anzahl der Färbg.	Mittelwerte der PLEH Streifen n	stat. Alb.	Streifen n	gel. Alb.	Mittelwerte der PLEH stat.PA n		gel.PA n	
I	2	18	59,6	3	62,5	18	38,0	3	39,1
II	9	18	64,3	9	61,5	18	73,0	9	37,7
III	4	18	62,6	9	60,4	18	61,1	9	38,1
IV	3	10	82,5	4	74,8	8	48,9	7	38,7
V	5	10	74,5	4	72,0	10	54,2	9	52,5

Bei einem Vergleich der Planimetereinheiten zeigt sich, daß die elektrophoretisch gelaufenen Eiweißlösungen konstantere Werte ergeben als die stationären Standardstreifen. Dabei fallen die PA-Werte noch einheitlicher aus als die Albumin-Werte.
Hieraus ergibt sich, daß zur Ermittlung des Umrechnungsfaktors für Serumbestimmungen (s.S. 10) Anfärbbarkeitsversuche mit gelaufenem PA am günstigsten sind.

d) Einfluß der Lagerungszeit auf die Extinktion gefärbter Streifen:

Die Konstanz der gefärbten Streifen wurde durch mehrfache photometrische und planimetrische Auswertung ein

und desselben Streifens zu verschiedenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von mehreren Monaten geprüft. In der Zwischenzeit wurden die gefärbten Streifen unter Lichtabschluß bei Raumtemperatur aufbewahrt. Untersucht wurden gelaufene und stationäre PA- und Albuminstreifen mit unterschiedlichem Proteingehalt (Abb.2).

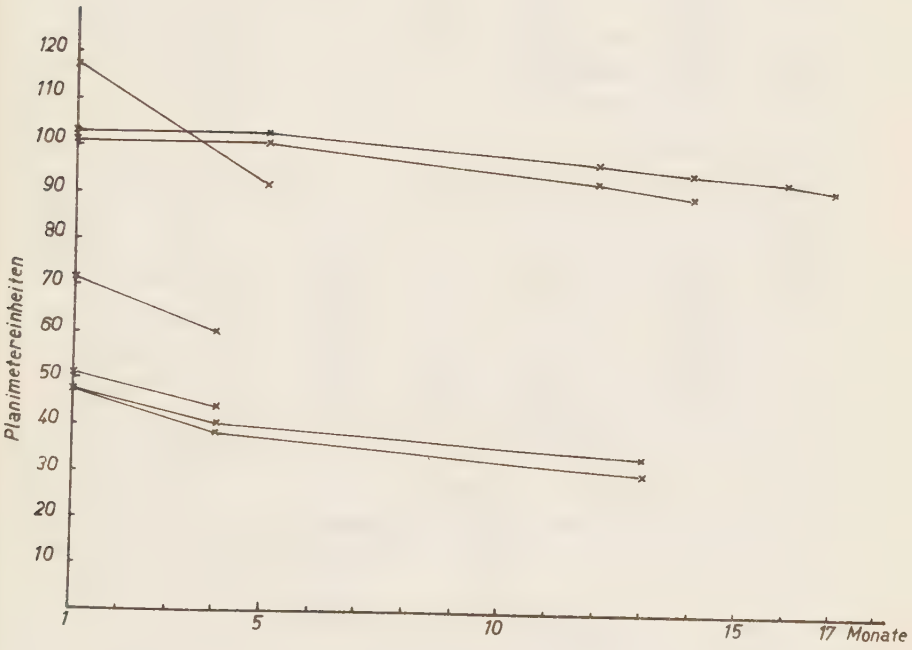


Abb. 2. Einfluß der Lagerungszeit auf die Extinktion gefärbter Streifen.

Abb. 2 zeigt mit zunehmender Lagerungszeit einen deutlichen Abfall der Planimetereinheiten. Dieses Abblassen der mit Amidoschwarz 10B angefärbten Proteinfraktion führt zu der praktischen Konsequenz, die gefärbten Agarstreifen sofort auszuwerten. Außerdem zeigt dieser Versuch, daß gefärbte Standardstreifen wohl zur Aufdeckung tageszeitlicher Photometerschwankungen, aber nicht zur langzeitigen Kontrolle des Photometers verwendbar sind.

C. Quantitative elektrophoretische Bestimmung der PA-Konzentration im Serum.

a) Berechnung und Eichkurve:

Serum-PA-Bestimmungen wurden mit der Agarelektrophorese nach der auf S. 2 beschriebenen Methode angefertigt und die gemessenen Planimeterwerte mittels eines Faktors in mg% umgerechnet. Nachdem durch Anfärbbarkeitsversuche festgestellt worden war, daß die gelaufenen PA-Streifen die konstantesten Werte ergaben (s.S. 8), wurde mit ihrer Hilfe der Umrechnungsfaktor für jede Agarcharge und Farblösung neu ermittelt.

Faktorberechnung:
Um die gefundenen Planimetereinheiten in mg% Protein umrechnen zu können, muß zuerst der Faktor bestimmt werden, der angibt, wieviel mg Protein e i n e r Planimetereinheit entspricht. Als Beispiel werden hier die Werte für gelaufenes PA des IV.Anfärbbarkeitsversuches (s.S. 8) herangezogen. In diesem Versuch ergeben 0,07 ml einer 40 mg% PA-Lösung = 0,028 mg Praealbumin einen Planimeterwert von 38,7 Einheiten. Für 1 mg PA läßt sich aus dem Ansatz $\frac{1}{0{,}028}$ x 38,7 ein Planimeterwert von 1382 Einheiten ermitteln. Eine Planimetereinheit würde also 1/1382 mg Protein entsprechen. Diese Proteinmenge liegt in 0,07 ml Serum vor. Bei Umrechnung in mg% ergibt sich folgender Faktor:

$$\text{PLEH} \times \frac{1 \times 100}{1382 \times 0{,}07} = \text{PLEH} \times \underbrace{1{,}03}_{\text{Faktor}} = \quad \text{mg\% PA}$$

Beispiel: 38,7 PLEH x 1,03 = 39,8 mg% PA

In Tabelle 3 sind die PA-Werte in Planimetereinheiten und mg% von 10 Normalseren, die zweimal zu verschiedenen Zeitpunkten mit jeweils unterschiedlichen Agarchargen und Farblösungen untersucht wurden, aufgeführt.

Trotz der unterschiedlichen Planimetereinheiten ergeben die mit dem jeweiligen Faktor errechneten mg%-Werte eine gute Übereinstimmung.

Tabelle 3.

PA-Werte von 10 Normalseren

Serum	Agar-charge	Farb-lösung	Färbung	PLEH	xFaktor	mg%
1	39	I	3.	36,5	1,04	38,0
	57	IV	1.	43,0	0,76	32,7
2	39	I	3.	38,5	1,04	40,0
	57	IV	1.	46,0	0,76	35,0
3	39	I	5.	29,0	1,04	30,2
	60	V	1.	55,0	0,62	34,1
4	39	I	5.	23,5	1,04	24,4
	60	V	1.	42,0	0,62	26,1
5	39	I	7.	27,2	1,04	28,3
	26	V	1	48,5	0,56	27,2
6	39	I	7.	21,2	1,04	22,0
	60	V	1.	40,5	0,62	25,2
7	39	III	11.	24,5	1,04	25,5
	60	IV	7.	38,0	0,58	22,2
8	39	III	11.	24,1	1,04	25,0
	60	IV	6.	45,0	0,58	26,2
9	39	III	12.	22,3	1,04	23,2
	60	IV	7.	50,0	0,58	29,0
10	39	III	12.	25,3	1,04	26,4
	26	V	1.	49,3	0,56	27,6

Eichkurve:

Die Eichkurve wurde mit stationären PA-Streifen durch Auftragungen von je 0,07 ml 10, 20, 30 und 40 mg% PA-Lösung hergestellt (Abb. 3, S.12).

Wie nach den Untersuchungen von WIEME[57] und BURTIN[13] bei quantitativen Serumbestimmungen auf Agar schon anzunehmen war, zeigt das Ergebnis keine strenge Linearität zwischen Planimetereinheiten und Proteinkonzentration(siehe eingezeichnete Gerade in Abb.3). Aus der Eichkurve geht hervor, daß die höher als normal liegenden PA-Werte zu hoch angegeben werden, während bei PA-Verminderungen zu niedrige PA-Werte gefunden werden. Da die von uns gewählte Konzentration der Standardlösung aber in dem zu erwartenden Größenbereich der Normalwerte liegt, wurde diese Abweichung der Eichkurve für die Bestimmung der Normalwerte vernachlässigt. Zwei unter verschiedenen Agar- und

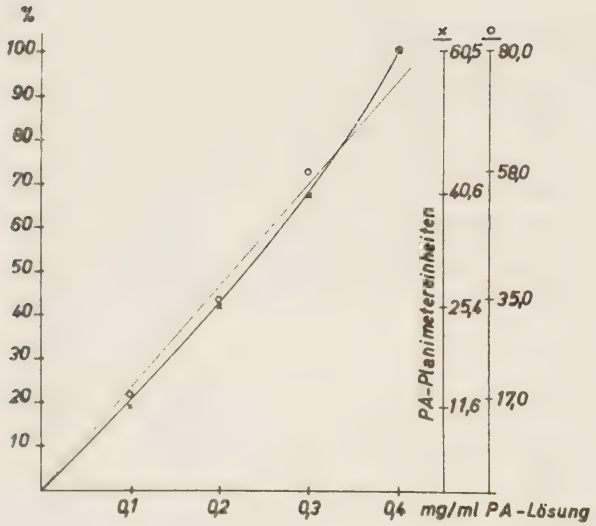


Abb. 3 zeigt 2 unter verschiedenen Agar- und Färbebedingungen aufgestellte Eichkurven (o,x). 100 % = Standardstreifen 0,4 mg PA/ml. Es wurde eine Gerade eingezeichnet, die die Eichkurve im Bereich der Normalwerte schneidet.

Färbebedingungen aufgestellte Eichkurven (o,x, Abb.3) zeigen bei Umrechnung auf 100% (= Planimetereinheiten des Standardstreifens von 0,4 mg PA/ml) eine gute Übereinstimmung der Werte, so daß bei Vorliegen des für die jeweiligen Färbebedingungen zuständigen Standardwertes die dazugehörige Eichkurve konstruiert werden kann.

b) Normalwerte:

Von 70 Normalseren wurde der PA-Gehalt mit der Agarelektrophorese in 3-facher Bestimmung ermittelt. Von allen Seren wurden der Gesamteiweißgehalt mittels Biuret festgestellt und Papierelektrophoresen angefertigt, deren normales Serumeiweißbild für die Auswahl der untersuchten Seren verantwortlich war. Das Serum wurde zum überwiegenden Teil von Blutspendern gewonnen, bei denen eine Hepatitis in

in der Anamnese ausgeschlossen werden konnte.
Der Mittelwert für PA im Serum beträgt nach den Untersuchungen an 70 Normalpersonen 30,0 mg% ± 7,44 S, wobei in Übereinstimmung mit anderen Autoren[44)47)56)] die Normalwerte von Männern höher liegen als die von Frauen. Nachfolgend werden die Mittelwerte ($\bar{x}$), Anzahl der Einzelwerte (N) und die Standardabweichungen (S) der Mittelwerte für Männer und Frauen aufgeführt.

Männer	Frauen
$\bar{x}$ = 31,9 mg%	$\bar{x}$ = 27,5 mg%
N = 40	N = 30
S = ± 7,58	S = ± 6,22

Bei der Prüfung der Signifikanz der Mittelwerte von Männern und Frauen zeigt sich, daß entsprechend den Beobachtungen von SCHAUPP[47)] und WIEGAND[56)], aber im Gegensatz zu Untersuchungen von NIEMANN[44)], die Mittelwerte von männlichen und weiblichen Normalpersonen nach der t-Verteilung sich nicht signifikant unterscheiden

N = 70
t = 2,67
p =<0,01

Eine Aufschlüsselung nach dem Alter und Gewicht der untersuchten Personen ergab keine auffällige Abhängigkeit der Werte.

c) Cyclusabhängigkeit:

Durch Untersuchungen von ALY und NIEDERHELLMANN[6)] und WIEGAND[56)] ist bekannt, daß das PA am Ende der Schwangerschaft erhöht ist. Außerdem stellte SCHAUPP[47)] bei Frauen eine größere Streuung der PA-Werte fest als bei Männern. Beide Ergebnisse waren Veranlassung, eine evtl. Cyclusabhängigkeit des Praealbumins zu prüfen.
Zur Klärung dieser Fragestellung wurde der PA-Wert im Serum von 6 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 24 Jahren mehrmals während eines Cyclus agarelektrophoretisch be-

stimmt. Zusätzlich wurden das Gesamteiweiß mittels Biuret gemessen und Papierelektrophoresen angefertigt. Zwecks genauer Feststellung des Follikelsprunges wurden die Basaltemperaturen gemessen und jeweils um diesen Zeitpunkt mehrfach Blut entnommen.

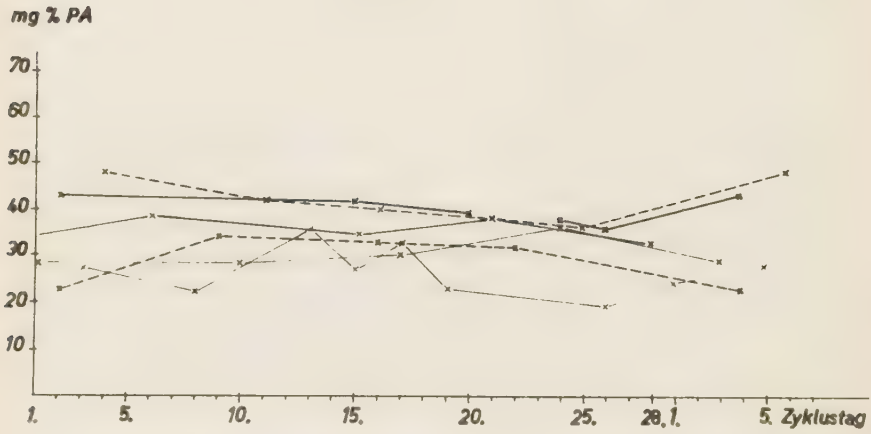


Abb. 4. Serum-PA-Werte von 6 Frauen im Verlauf eines Cyclus.

Unter den 70 Personen, bei denen PA im Serum bestimmt wurde, befanden sich 23 Frauen zwischen 21 und 40 Jahren, die am Tage der Blutentnahme den Cyclustermin angeben konnten. Deshalb war es mäglich, ihre PA-Werte mit den 6 oben genannten Fällen in einer zweiten Tabelle zusammenzustellan.

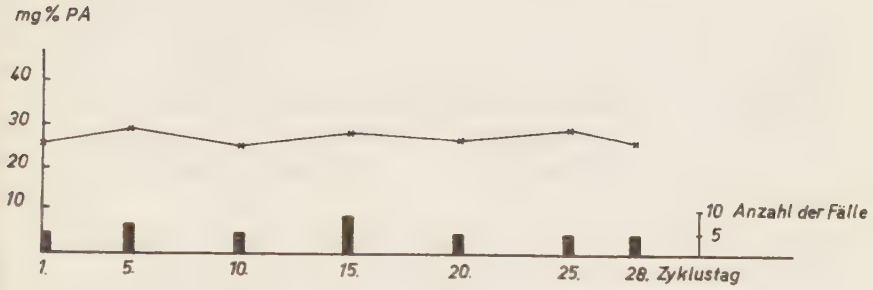


Abb. 5. Serum-PA-Werte von 29 Frauen im Verlauf eines Cyclus.

Wie die Abbildungen zeigen, ist eine Cyclusabhängigkeit des Praealbumins nicht zu erkennen. Die Streuung der PA-Werte geht nicht über die Fehlerbreite der Methode hinaus. Auch die Gesamteiweißbestimmungen und papierelektrophoretischen Untersuchungen der einzelnen Eiweißfraktionen zeigen keine auffälligen Veränderungen.

D. Einflüsse von Temperatur und Lagerung auf die Praealbumingröße.

1958 wurden von ALY und NIEDERHELLMANN[6] die Einflüsse der Lagerung von Serum bei 4°C auf die PA-Größe papierelektrophoretisch geprüft. Die Autoren fanden im Normalserum eine Zunahme der PA-Größe um den 20.-30.Tag, bei Seren mit PA-Verminderungen eine PA-Zunahme geringeren Ausmaßes um den 30.Tag, und bei stark vermindertem PA keine Änderung der PA-Größe über einen Zeitraum von 4 Wochen. Diese Ergebnisse werden immunologisch und agarelektrophoretisch überprüft.

Seren von 3 gesunden Personen und von 3 Hepatitiskranken wurden sofort nach Blutentnahme in 3 Gruppen aufgeteilt und bei -15°C, 4°C und 20°C (Zimmertemperatur) aufbewahrt. Die steril in Portionen abgefüllten und gelagerten Seren wurden vor der Elektrophorese auf Keimfreiheit geprüft[x]. 5 Wochen lang wurde dann alle 8 Tage von allen 3 Portionen eine PA-Bestimmung mit der Agarelektrophorese durchgeführt. Färbung wie üblich mit Amidoschwarz 10B und zusätzlich ein Agarstreifen mit Sudan III (Kontrolle mit Ölrot). Gleichzeitig wurden von allen Seren jede Woche Papierelektrophoresen angefertigt sowie das Gesamteiweiß und die Fettsäuren bestimmt[xx].

Ergebnisse:

Gesamteiweiß: Bei allen Seren, die bei -15°C und 4°C aufbewahrt wurden, zeigt sich über einen Zeitraum von 4 Wochen keine Veränderung des Gesamteiweißgehaltes. Alle bei 20°C aufbewahrten Seren zeigen einen geringen Anstieg des Gesamteiweißes ab der 3.Woche.

Papierelektrophoresen: Bei allen 3 Temperaturen findet sich keine auffallende Veränderung der einzelnen Fraktionen. Bei 20°C ist lediglich die Albuminfraktion in 4 von 6 Fällen erhöht.

---

x) Die bakteriellen Untersuchungen wurden freundlicherweise vom Hygiene-Institut der Univ.Marburg durchgeführt, wofür ich Herrn Dr.med. Schiff meinen Dank aussprechen möchte.

xx) Für die Durchführung der Fettsäurenbestimmungen[18)19)] möchte ich Herrn Dozent Dr. Eggstein recht herzlich danken.

Fettsäuren: Bei allen Seren, die bei 4°C und -15°C gelagert wurden, sind die Werte über 4 Wochen konstant. Alle untersuchten Seren, die bei 20°C aufbewahrt wurden, zeigen ab der 3.Woche einen Abfall der Werte.

Praealbumin: Bei den 3 Normalseren findet sich bei den bei -15°C und 4°C gelagerten Seren keine Veränderung der PA-Größe. Die Seren, die bei 20°C aufgehoben wurden, zeigen bereits ab der 2.Woche eine deutliche Zunahme des Albuminvorläufers sowie ab der 3.Woche das Auftreten eines zusätzlichen Vorläufers (Abb. 6 oben + Abb. 7a).

Bei den 3 Hepatitisseren ist das PA sehr erniedrigt. Lagerungseinflüsse der bei -15°C und 4°C aufbewahrten Seren fehlen. In zwei Fällen führte die Lagerung der Seren bei Zimmertemperatur nach der 4.Woche zu einer geringen Erhöhung der PA-Fraktion und zum Auftreten eines PA-Vorläufers (Abb. 6 unten + Abb. 7b).

Fettfärbung:

Bereits vorliegende Untersuchungen über Albumin-Vorläufer [23)28)39)40)41)] führten dazu, daß 1958 von ALY und NIEDERHELLMANN[6)] Papierelektrophoresen auf das Vorkommen sudanophiler Fraktionen vor dem Albumin geprüft wurden. Bei normalem und vermindertem Praealbumin fand sich eine minimale, nicht regelmäßig nachweisbare, sudananfärbbare Zone im PA-Bereich. EGGSTEIN[50)] beschreibt einen Fettvorläufer auf dem ebenfalls von uns benutzten Papier, der wahrscheinlich auf Papierverunreinigungen zurückzuführen ist. Auch nach den bisher vorliegenden biochemischen Befunden[1)51)] enthält reines tryptophanreiches Praealbumin keine sudanophilen Substanzen.

Werden Seren bei -15°C oder 4°C 4-5 Wochen gelagert, läßt sich keine sudananfärbbare Zone nachweisen. Lagerung bei 20°C führt zum Auftreten einer deutlich nachweisbaren lipohaltigen Fraktion im PA-Bereich und vor dem Praealbumin (Abb. 7).Letztere Fraktion bezeichneten wir als Y (Abb.8).

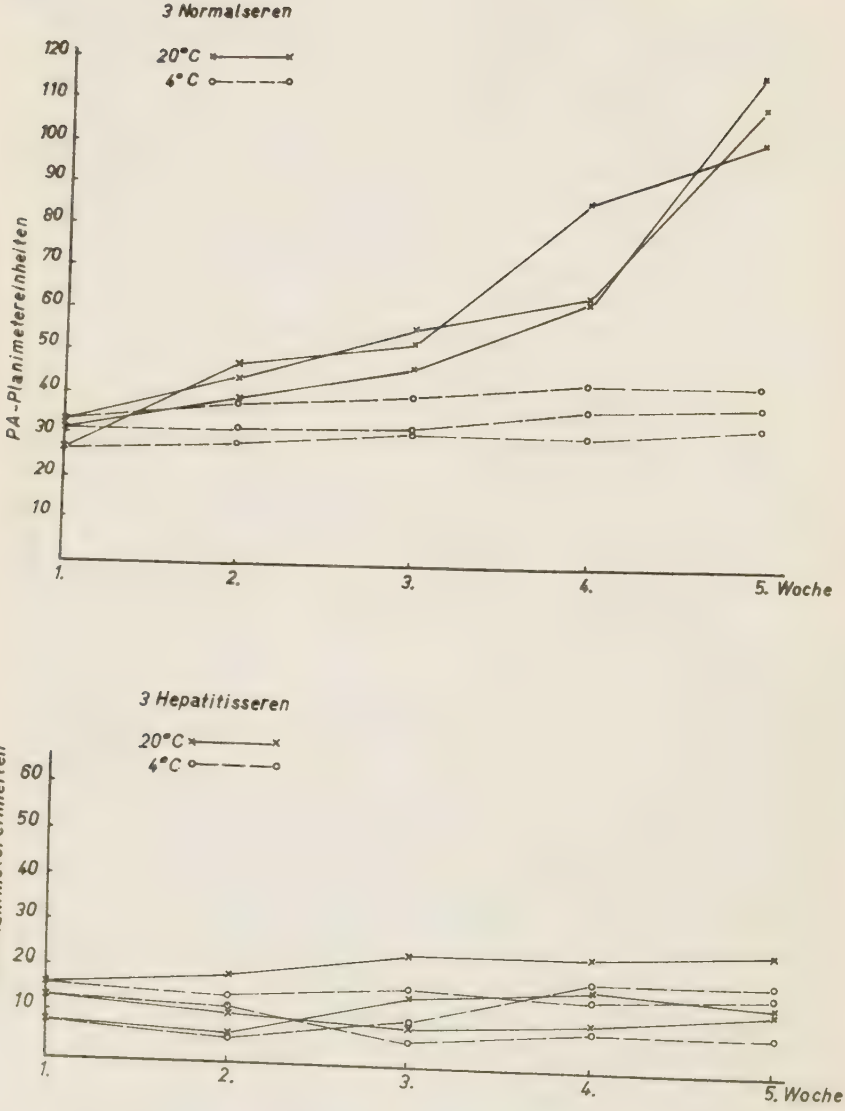


Abb. 6. PA-Werte in Planimetereinheiten von Seren, die 4 Wochen lang bei 4°C und 20°C gelagert wurden (oben Normalseren, unten Hepatitisseren).

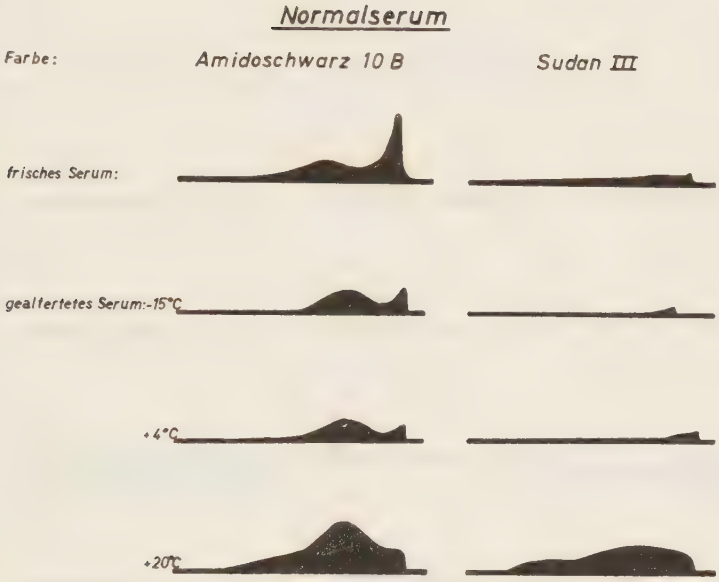


Abb. 7a. Praealbuminfraktion von frischem und bei verschiedenen Temperaturen gelagertem Normalserum (Agarelektrophorese: Amidoschwarz 10B- und Sudanfärbung).

Sie färbt sich sowohl mit Amidoschwarz als auch mit Fettfarbstoffen an.
Bei Normalseren läßt sich die Fettfraktion ab der 3.Woche, bei Hepatitisseren mit verminderem Praealbumin ab der 4.-5.Woche, im allgemeinen weniger stark ausgeprägt, nachweisen. Alle Ergebnisse ließen sich mit Alkohol-Ölrotfarbe reproduzieren.
Es ist sicher, daß die bei Alterung beobachtete scheinbare Vergrößerung des PA durch die färberisch nachweibaren Lipokomplexe bedingt ist. Diese Auffassung bestätigen die immunologischen Versuche (s.S. 48), die klar zeigen, daß Serumalterung nicht zu einer Vermehrung des tryptophanreichen Praealbumins führt.

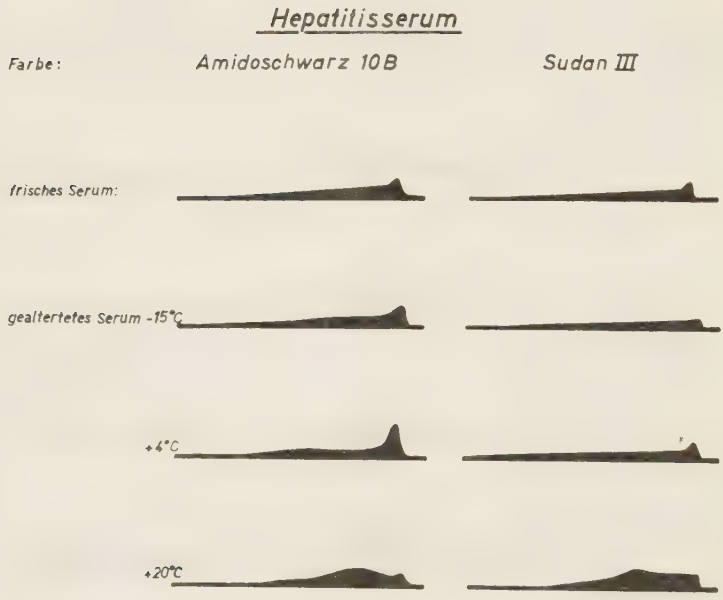


Abb. 7b. Praealbuminfraktion von frischem und bei verschiedenen Temperaturen gelagertem Hepatitisserum (Agarelektrophorese: Amidoschwarz 10B- und Sudanfärbung).

gealtertetes Normalserum (+20°C)

Amidoschwarz 10 B *Sudan III*

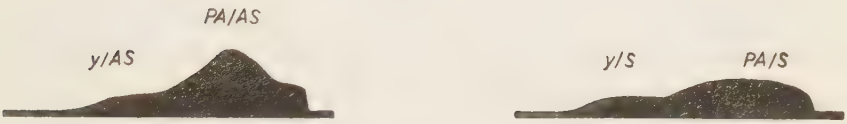


Abb. 8. Diagramme einer Agarelektrophorese von Serum, das 4 Wochen steril bei 20°C gelagert wurde.

Y/AS = Amidoschwarz anfärbbare Fraktion vor dem PA

PA/AS = Amidoschwarz anfärbbare Fraktion im PA-Bereich

Y/S = Sudananfärbbare Fraktion vor dem PA

PA/S = Sudananfärbbare Fraktion im PA-Bereich

Immunologische Untersuchungen.

A. Einführung und Problemstellung.

Ursache der immunologischen Spezifität und der Artspezifität der Plasmaproteine ist die Art der Anordnung der Aminosäuren im Peptidgefüge. Immunologische Verfahren ermöglichen eine Unterscheidung der einzelnen Plasmaproteine[22)24)53)].

Die quantitative immunchemische Proteinbestimmung von HEIDELBERGER[30)34)], bei der der N-Gehalt isolierter Immunpraecipitate bestimmt wird, ist sicherlich die genaueste Methode. Sie erfordert jedoch große Mengen Antiserum, die aus finanziellen und technischen Gründen oft schwer zu erhalten sind. Wir arbeiteten daher mit einer von SCHULTZE und SCHWICK[53)] entwickelten quantitativen immunologischen Mikrobestimmungsmethode, die im Prinzip der HEIDELBERGER'schen Methode entspricht[9)10)42)45)]. Hier werden mit einer quantitativen Trübungsmessung die Antigen-Antikörperkomplexe bestimmt und auf eine Eichkurve bezogen.

Eine quantitative Bestimmung des PA war erst möglich, nachdem ein geeignetes, spezifisches PA-Antiserum vorlag, das uns freundlicherweise zugleich mit gereinigtem Proteinantigen von Herrn Professor SCHULTZE zur Verfügung gestellt wurde[x)]. Mit Hilfe der immunologischen Technik solltendie elektrophoretische PA-Bestimmung überprüft und aufgetretene Widersprüche zwischen Elektrophorese und immunologischer Untersuchung bei der PA-Bestimmung von Hepatitisseren mit beiden Methoden aufgeklärt werden.

In orientierenden Vorversuchen wurde ein Vergleich der immunologischen und elektrophoretischen Bestimmungen des PA durchgeführt. Die Bestimmungen zeigten bei normalen Seren eine gute Übereinstimmung. Diskrepanzen ergaben

---

x) Herrn Prof.Dr. H.E. Schultze und Herrn G. Schwick danke ich für die Einführung in die quantitative immunologische Proteinbestimmungsmethode, die großzügige Überlassung von Reinproteinen und Antiseren sowie für die Durchführung von Vergleichsbestimmungen.

sich bei Serum mit erhöhten Bilirubingehalt. Hier lagen die elektrophoretischen Werte durchweg wesentlich niedriger. Zur Abklärung dieser Befunde wurde die PA-Größe eines Normalserums, eines Hepatitisserums und einer Mischung beider Seren, 1:1, agarelektrophoretisch und immunologisch bestimmt und der gefundene Wert des Mischserums (Hepatitisserum + Normalserum) mit dem aus Normalserum + Hepatitisserum errechneten verglichen. Ein Beispiel dieser Versuche ist in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4.

	Elektrophorese-Bestimmung mg%	Immunologische Bestimmung mg%
A Normalserum	28	28
B Hepatitisserum	3	22
Errechneter Wert aus A+B (1:1)	16	25
gemessener Wert aus A+B (1:1)	15	15

Bei recht guter Übereinstimmung der Werte der Normalseren fiel bei den immunologischen Untersuchungen eine Abweichung für das Hepatitisserum und das gemischte Serum auf. Agarelektrophoretisch wurde der theoretisch errechnete Wert für das gemischte Serum bestätigt. Die nachfolgenden Untersuchungen befassen sich mit dem Studium dieses auffälligen Phänomens.

a) Quantitative immunologische Methode der PA-Bestimmung im Serum.

Die Bestimmungen wurden im Prinzip nach Angaben von SCHULTZE und SCHWICK[53] durchgeführt.

1. Material:
Gereinigtes Proteinantigen und spezifische Antiseren wurden von den Behringwerken zur Verfügung gestellt.

Als Verdünnungsflüssigkeit für Antiseren und die zu untersuchenden Seren wurde eine m/15 Phosphatpuffer-Kochsalz-Lösung (pH 7,5) verwendet.
Die Verdünnung des Antiserums hängt von seinem Antikörpertiter ab. In diesen Untersuchungen wurde lt. Angaben der Behringwerke für PA-Bestimmungen eine Verdünnung von 1:5 und für Transferrinversuche eine Verdünnung von 1:10 gewählt. Die zu untersuchenden Seren mußten verdünnt werden, damit die Extinktionen der Trübungsmessung in den aufsteigenden Schenkel der Eichkurven fallen. Um eine Messung im Bereich des Antigenüberschusses auszuschließen, wurden Doppelbestimmungen mit verschiedenen Verdünnungen durchgeführt.
Verdünnungen bei PA-Untersuchungen: 1:10, 1:5, 1:3.
Verdünnungen bei Transferrinbestimmungen: 1:30, 1:15.
Die Trübungsmessungen wurden in 1 cm Halbmikroküvetten bei einer Wellenlänge von 450 mμ im Elko III (Zeiss) durchgeführt.

2. Aufstellung von Eichkurven:
Mit m/15 Phosphatpuffer wurden verschiedene Verdünnungen einer Standardproteinlösung hergestellt. In sorgfältig gereinigte Reagenzgläser wurden zu 0,1 ml der vorbereiteten Eichlösungen in Abständen von 2 Minuten je 1,0 ml hergestellter Antiserumlösung pipettiert. Die durch Immunpraecipitation verursachte Trübung wurde in genau eingehaltenen Zeitintervallen (15 Minuten nach Antiserumzugabe) im Elko III bei 450 mμ gegen einen unveränderten Standardwert von 1,0 ml Antiserumverdünnung + 0,1 ml Phosphatpuffer abgelesen. Ein Antigenleerwert, bestehend aus 0,1 ml Proteinverdünnung + 1,0 ml Puffer, wurde gegen 1,1 ml Phosphatpuffer gemessen und rechnerisch vom ersten Meßwert abgezogen.
Zur Darstellung der Tatsache, daß die Immunpraecipitate im Überschuß des Antigens löslicher werden,

wurde eine Eichkurve mit zunehmenden PA-Mengen aufgestellt, die sowohl den aufsteigenden als auch den absteigenden Schenkel der Kurve umfaßt (Abb.9, I).

Für quantitative Proteinbestimmungen ist nur der aufsteigende Kurvenast als Bezugssystem geeignet[53].

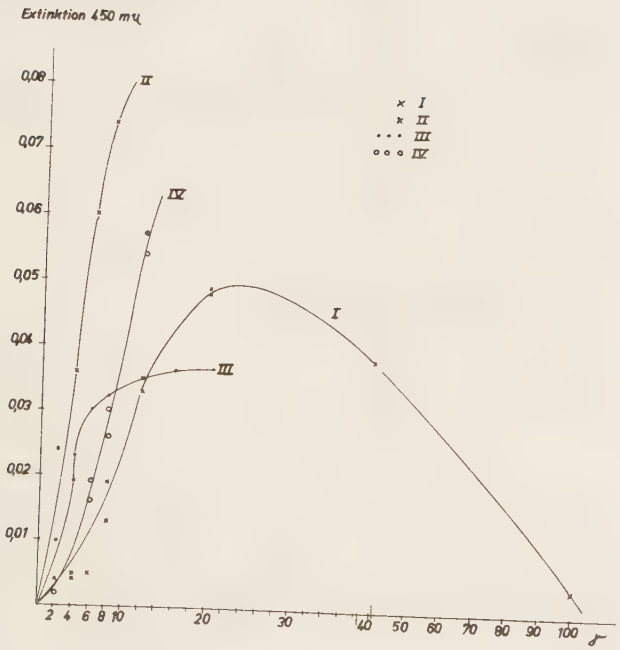


Abb. 9. Eichkurven für die immunologische PA-Bestimmung, die mit verschiedenen Anti-Serum-Chargen hergestellt wurden (Einzelheiten s. Text).

3. Ausführung der Bestimmungen:

Hier wurde wie bei der Ausführung der Eichkurven vorgegangen. Die verschiedenen Serumverdünnungen wurden vorbereitet und nach Zugabe von Antiserum die durch Immunpraecipitation verursachte Trübung, bei Einhaltung einer Trübungszeit von 15 Minuten, gegen einen Antiserumleerwert gemessen. Um die Eigentrübung des Serums zu berücksichtigen, wurde der Antigenleerwert vom Hauptwert rechnerisch abgezogen.

Beispiel einer PA-Bestimmung:

	Extinktion 450 mμ
A) Hauptwert 0,1 ml 1:5 verdünntes Serum + 1,0 ml 1:5 " PA-Antiserum	0,019
Leerwert I 0,1 ml m/15 Phosphatpuffer + 1,0 ml 1:5 verdünntes PA-Antiserum	
B) Antigenleerwert 0,1 ml 1:5 verdünntes Serum + 1,0 ml m/15 Phosphatpuffer	0,007
Leerwert II 1,1 ml m/15 Phosphatpuffer	
	0,012

Auf der Eichkurve IV (Abb.9) entspricht die Extinktion von 0,012 einem PA-Gehalt von 5,1 γ. Die absolute PA-Menge wird unter Berücksichtigung des Verdünnungsgrades wie folgt berechnet:

Gefundene Proteinmenge x Serumverdg. x Ansatzverdg. = mg/ml Serum

5,1 x 5 x 11 = 0,28 " "

= 28 mg%

Methodische Voruntersuchungen.

a) Transferrinbestimmung im Serum.

Wegen des nur in geringen Mengen zur Verfügung stehenden kostspieligen Antipraealbuminserums wurden zur Einarbeitung Vorversuche mit einem Transferrin-Antitransferrinsystem durchgeführt. Ausführung der Untersuchungen wie bei der PA-Bestimmung. Das Antitransferrinserum wurde 1:10 und die zu untersuchenden Seren 1:15 und 1:30 mit m/15 Phosphatpuffer verdünnt[53].

Zeitkurve.

Um bei unseren Versuchsbedingungen das quantitative Verhalten der auftretenden Trübung beurteilen zu können, wurde der zeitliche Ablauf einer Antigen-Antikörperreaktion (Transferrin + Antitransferrin) im durchfallenden Licht bei 450 mμ verfolgt. Das Ergebnis ist in Abb.10 aufgezeichnet.

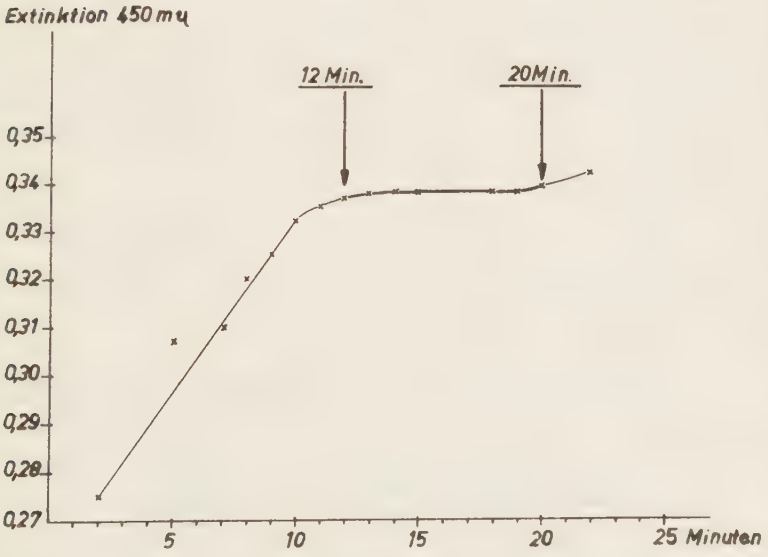


Abb. 10. Trübungswerte (450 mμ, 1 cm Küvette) eines Transferrin-Antitransferrinsystems in Abhängigkeit von der Zeit.

Dabei ergibt sich, daß die der Trübung entsprechenden Extinktionen in einem Zeitraum von 12-20 Minuten konstant bleiben. Der angegebene Ablesungszeitpunkt von 15 Minuten[53)] nach Zugabe des Antiserums zum Antigen konnte deshalb auch in unseren Versuchen als optimal angesehen werden und wurde streng eingehalten.

Quantitativer Vergleich der immunologischen und chemischen Transferrinbestimmung im Serum.

Nach Aufstellung einer Transferrineichkurve (Abb.11)

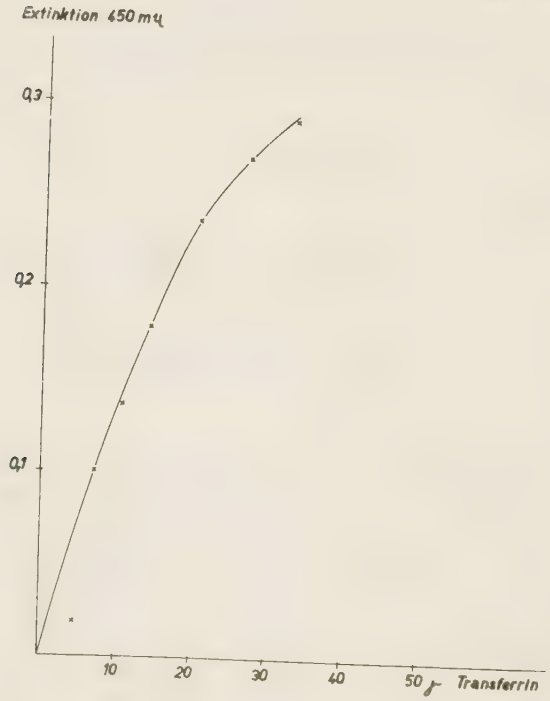


Abb. 11. Eichkurve für die immunologische Transferrinbestimmung.

wurde der Transferringehalt von 4 Seren immunologisch bestimmt. Zur Kontrolle wurde die Gesamt-Eisenbindungskapazität der gleichen Seren chemisch ermittelt. Die chemischen Bestimmungen wurden nach einer Modifikation der Mikromethode von DAVIES, LEVIN und OBERHOLZER[14] sowie BRENDSTRUP [12], - die im Prinzip von LAURELL[37] entwickelt wurde -, durchgeführt. Die Umrechnung der immunologisch in mg/ml bestimmten Transferrinwerte auf die chemisch in γ % bestimmte Eisenbindungskapazität des Serums erfolgte über den Faktor 1,3, der von SCHULTZE und Mitarb.[52] angegeben wurde. Der Faktor 1,3 entspricht dem Eisenbindungsvermögen bei pH 7,4 und ist als $\frac{\gamma \text{ Eisen}}{\text{mg Transferrin}}$ definiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Die Übereinstimmung der Werte kann als zufriedenstellend angesehen werden.

Tabelle 5.

Name	Diagnose	mg/ml Transferrin	Eisenbindungskapazität in γ % immunol.	chemisch
Blö.	prim.chron. Polyarthritis	1,98	257	283
Bu.	"	2,39	311	228
Güt.	abgeklungene Hepatitis	2,09	271	260
Bro.	Tbc	1,60	208	198

) Einfluß des Serumbilirubins auf die quantitative PA-Bestimmung.

Bei der quantitativen immunologischen Bestimmung des Transferrins lagen die durch die Immunpraecipitation verursachten Extinktionen wesentlich höher als bei der PA-Bestimmung. Die folgende Aufstellung gibt zur Veranschaulichung ein Beispiel der Extinktionen der gemessenen Trübungen von Transferrin-und PA-Standardlösungen

wieder. Die Werte sind der Eichkurve IV der Abb. 9 entnommen.

Proteinkonzentration in γ/0,1 ml	Transferrin Ext. 450 mμ	Praealbumin Ext. 450 mμ
5	0,075	0,012
10	0,135	0,042
20	0,232	-

Als spezifische Trübung wird im weiteren Verlauf die durch die Antigen-Antikörperreaktion verursachte Extinktion bezeichnet, nachdem durch entsprechende Leerwertbestimmungen die unspezifische Trübung des Antiserums und die Eigentrübung des Serums (Antigen) durch Subtraktion eliminiert wurden.

Bei den sehr niedrigen PA-Extinktionen war zu erwarten, daß höhere unspezifische Extinktionen die Meßgenauigkeit des Praealbumins beeinflussen könnten. Deshalb wurden zur Bestimmung der Größenordnung der unspezifischen Trübungseinflüsse Ansätze im Spektralphotometer gemessen und festgestellt, bei welcher Wellenlänge die sogenannten spezifischen Praecipitate in unserer Versuchsanordnung die größten Extinktionen ergeben.

Bestimmung der Extinktion der spezifischen Praecipitate.

Von einem Normalserum mit unauffälliger Serumfarbe wurden für die folgenden Ansätze im Spektralphotometer Absorptionskurven von 350-500 mμ aufgenommen (Abb. 12).

I. Hauptwert

0,2 ml 1:5 verdünntes Serum
+1,0 ml 1:5 " PA-Antiserum

= spezifische Trübung + unspezifische Eigentrübung des Antiserums

Leerwert I

0,2 ml 1:5 verdünntes Serum
+1,0 ml m/15 Phosphatpuffer

II. Hauptwert

0,2 ml 1:5 verdünntes Serum
+1,0 ml 1:5 " PA-Antiserum

Differenz zwischen I. und II.Ansatz (II.minus I.) = unspezifische Eigentrübung des Serums

Leerwert II

0,2 ml 0,9% NaCl
+1,0 ml m/15 Phosphatpuffer

III.Leerwert III

0,2 ml m/15 Phosphatpuffer
+1,0 ml 1:5 verdünntes PA-Antiserum

gemessen gegen
1,2 ml m/15 Phosphatpuffer

= unspezifische Eigentrübung des Antiserums

Differenz zwischen I. und III.Ansatz (I.minus III.) = spezifische Trübung

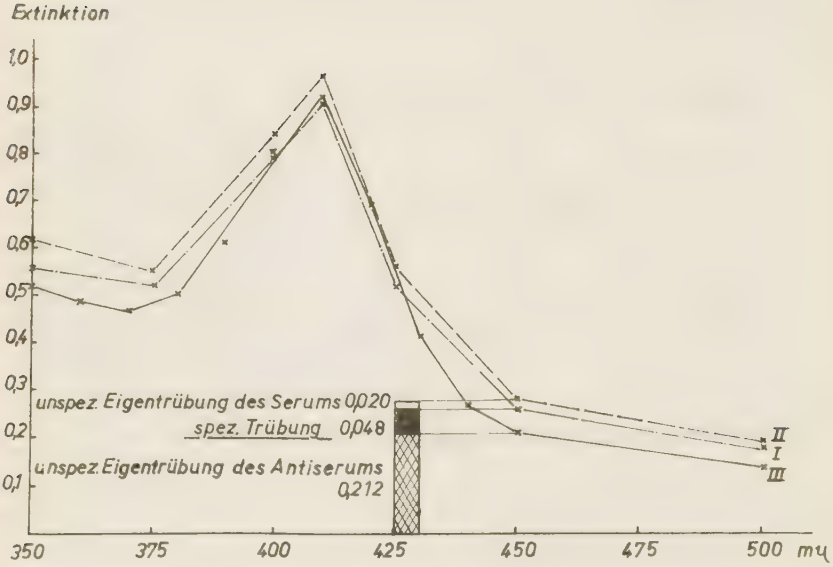


Abb. 12. Absorptionskurven der Ansätze I-III (s.Text) einer normalen immunologischen Serum-PA-Bestimmung nach der von SCHULTZE und SCHWICK[53] angegebenen Modifikation. Zeiss-Spektralphotometer, 1 cm Küvette. Die Messungen wurden in der Zeit der konstantesten Trübungswerte von 12-20 Minuten (s.Abb. 10) durchgeführt.

Wie aus Abb. 12 zu ersehen ist, zeigt die spezifische Trübung ihre größte Extinktion im Bereich von 450 mμ.

Prüfung der unspezifischen Bilirubinextinktion.

Die Größenordnung der durch bilirubinhaltiges Serum bedingten Lichtabsorption wurde, entsprechend den Serumverdünnungen des Originalansatzes der quantitativen immunologischen Bestimmung im Serum, überprüft.

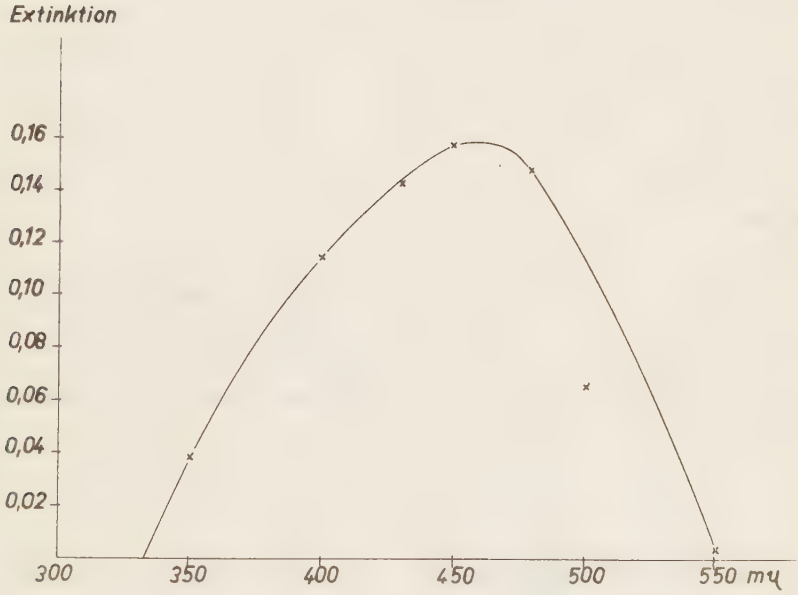


Abb. 13. Absorptionskurve eines bilirubinhaltigen Serums. Ansatz 0,2 ml eines 1:10 verdünnten Serums + 1,0 ml Phosphatpuffer gegen 1,2 ml Phosphatpuffer.

Es zeigt sich, daß das Bilirubinmaximum in den für Trübungsmessungen optimalen Wellenlängenbereich von 450 mμ fällt (Abb. 13).

Um die Einflüsse der Bilirubinextinktionen zu mindern, wurden Trübungsmessungen bei 500 mμ durchgeführt. Diese ergeben aber für die spezifischen Trübungen, besonders im Bereich der hohen Antigenkonzentrationen, niedrigere Extinktionen als bei 450 mμ. Messungen bei 420 mμ zeigten dagegen, neben wiederum kleineren spezifischen Extinktionen, auch noch besonders hohe unspezifische Extinktionen des Antiserums (s. Abb. 14).

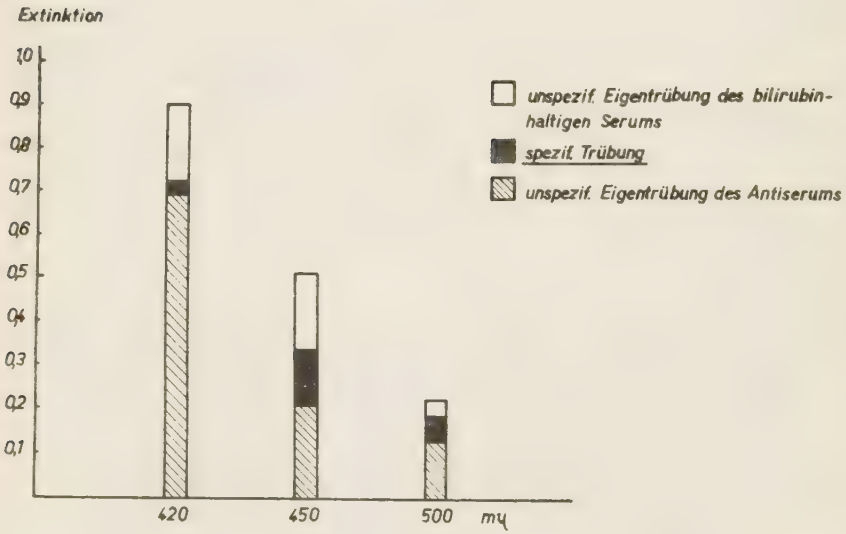


Abb. 14 zeigt das Verhältnis der spezifischen Trübung zu den unspezifischen Trübungen einer PA-Antigen-Antikörperreaktion bei verschiedenen Wellenlängen (s.Text).

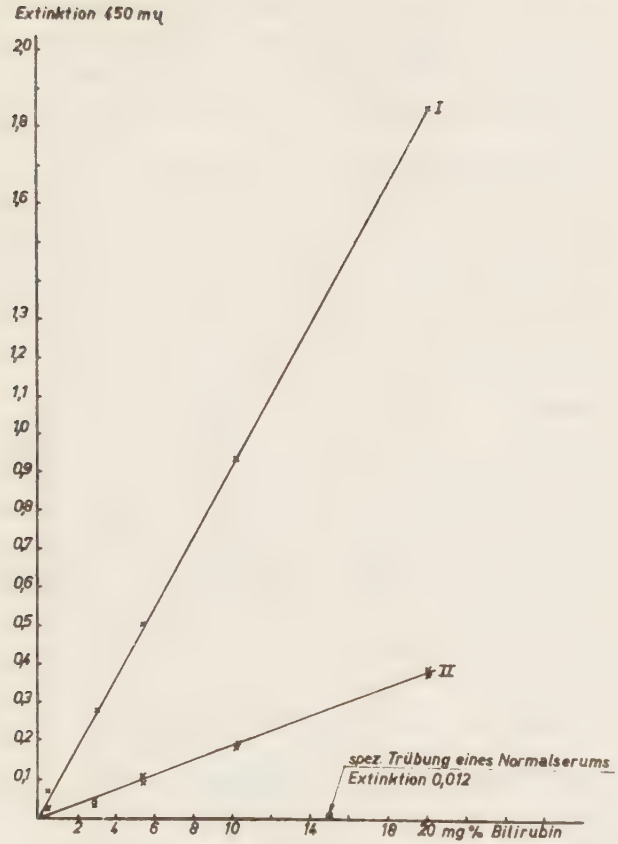


Abb. 15. Bilirubinabsorption eines 1:5 verdünnten Serums (I) und eines 1:55 verdünnten Serums (II) (Zeiss-Spektralphotometer, 1 cm Küvette).

Abb. 15 zeigt die Größenordnung der Bilirubinabsorption bei einer Bilirubinverdünnungsreihe. Sie wurde aus einem Serum mit erhöhtem Bilirubingehalt (20 mg%) durch Mischung mit Normalserum (0,4 mg% Ges.Bilirubin) einmal im Originalansatz der quantitativen Bestimmungs-

methode des 1:5 verdünnten Serums (I) und einmal für 11 mal höhere Bilirubinverdünnungen in Doppelbestimmungen hergestellt. In die Abbildung wurde zum Vergleich die Größenordnung der Extinktion der spezifischen Trübung eines Normalserums (Eichkurve IV, Abb.9) eingezeichnet.
Trotz der hohen Verdünnung des bilirubinhaltigen Serums von 1:55 (Abb.15 II) liegen die Extinktionen der Ansätze bei 450 mμ noch über den spezifischen Extinktionen des Praealbumins. Es muß darum diskutiert werden, ob bei hohem Bilirubingehalt des Serums nicht schon kleine Pipettierfehler des Serumleerwertes die wesentlich kleineren spezifischen Extinktionen erheblich verfälschen können.
Unter der Annahme, daß das untersuchte Hepatitisserum einen normalen PA-Gehalt von 30 mg% hätte, entspräche das lt. Eichkurve IV (Abb.9) einer spezifischen Extinktion von 0,015. Bei einem Bilirubingehalt des Serums von 20 mg%, der einer Extinktion von 0,382 entspräche, würde ein Pipettierfehler von 1% allein beim Serumleerwert schon eine Extinktion von 0,004 ergeben.
Bei Normalseren sind dagegen, wegen der niedrigen Serumleerwerte, Pipettierfehler zu vernachlässigen.

Immunologische Vergleichsuntersuchungen des Praealbumins bei normalen und bilirubinhaltigen Seren.

Verhältnis der spezifischen Trübung zu den unspezifischen.

Dieser Versuch soll als erstes die Anteile der verschiedenen Extinktionen, die an der quantitativen immunologischen Bestimmung des PA beteiligt sind, aufzeigen. Deshalb werden die Extinktionen für die verschiedenen Ansätze (I-III, s.S.31) getrennt bestimmt und in Abb. 16 graphisch dargestellt. Untersucht wurden ein Normalserum, ein Hepatitisserum und die Mischung gleicher Teile der Ausgangsseren.

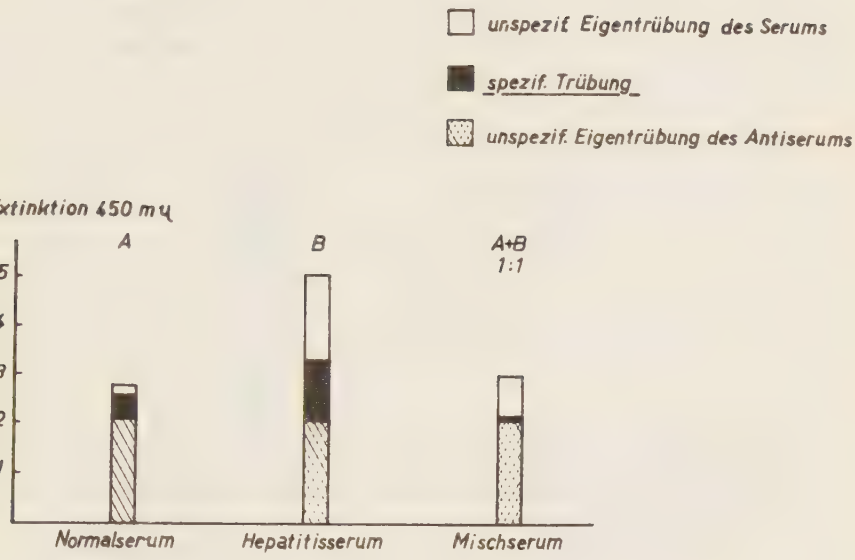


Abb. 16. Verhältnis der spezifischen Trübung zu den unspezifischen Trübungen bei einem Normalserum, einem Hepatitisserum und einem aus beiden Ausgangsseren (1:1) gemischten Serum (Versuchsanordnung s.S. 31).

Die Abb. 16 zeigt, daß bei der Bestimmung von Serum mit unauffälliger Serumfarbe das Verhältnis von spezifischer zu unspezifischer Trübung günstiger liegt als bei den bilirubinhaltigen Seren. Aus den Absorptionskurven, die für die bilirubinhaltigen Seren aufgestellt wurden, ist zu ersehen, daß wie bei dem Normalserum die Extinktion der sogen. spezifischen Trübung bei 450 mμ besonders hoch ist. Gleichzeitig ist aber die Eigentrübung der bilirubinhaltigen Seren, wie aus dem Versuch auf S.33 zu erwarten war, im Vergleich zur sogen. spezifischen Trübung bei dieser Wellenlänge unverhältnismäßig hoch.

Das führte zu der Annahme, daß diese große Eigentrübung trotz Berücksichtigung im Leerwert im Falle eines Verdünnungsfehlers die Messung stark beeinträchtigen könnte. Bei einem Vergleich der unspezifischen Serumeigentrübungen zeigt sich aber, daß die Serumeigentrübung des Mischserums zwar nicht direkt dem theoretisch zu erwartenden Wert aus Normalserum und Hepatitisserum entspricht, jedoch ungefähr die Hälfte der Serumeigentrübung des Hepatitisserums allein beträgt; ein Ergebnis, das, zumindest in diesem Versuch, gegen einen Einfluß eines Pipettierfehlers auf die Messung spricht. Dagegen zeigt die spezifische Trübung des Mischserums in keiner Weise irgendeinen Bezug zu einem der beiden Ausgangsseren.

Als zweites soll geprüft werden, wie weit sich zugesetztes PA wiederfinden läßt; einmal mit der quantitativen immunologischen Bestimmung, dann zur Kontrolle mit der Agarelektrophorese. Zu 0,1 ml nicht bilirubinhaltigem Serum (1:5 verdünnt) und 0,1 ml 0,9% NaCl-lösung wurden 1,0 ml Antiserum (1:5 verdünnt) zugesetzt, gegen einen Antiserum- und Antigenleerwert gemessen, und der PA-Gehalt immunologisch in Doppelbestimmungen ermittelt. Er betrug 13 mg% und 17 mg% (Mittelwert = 15 mg%).

In einem zweiten Ansatz wurde anstelle der 0,1 ml 0,9% NaCl-Lösung 0,1 ml einer 22 mg% PA-Lösung zugesetzt und der PA-Gehalt in gleicher Weise bestimmt. Das Ergebnis betrug 35 mg% (15 + 22 mg%) und erfaßte die zugesetzte Menge von 22 mg% PA vollständig.

Nach gleicher Versuchsanordnung wurde der PA-Gehalt eines bilirubinhaltigen Serums allein mit 4,4 mg% ermittelt. Nach Zugabe von wiederum 0,1 ml einer 22 mg% PA-Lösung zum ersten Ansatz wurde ein PA-Wert von 26 mg% erwartet; das tatsächlich gemessene Ergebnis betrug aber nur 6 mg% PA (Abb.17).

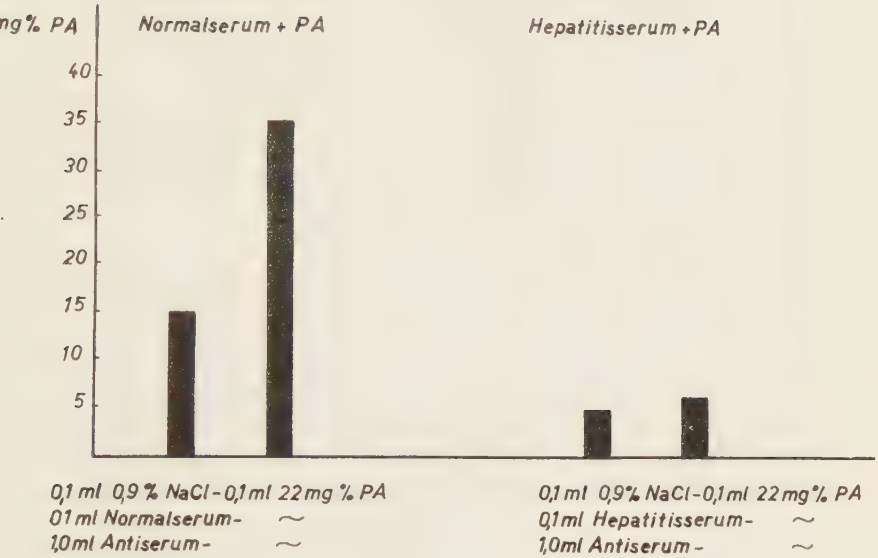


Abb. 17. Immunologische Praealbuminbestimmung eines normalen und eines bilirubinhaltigen Serums mit und ohne Zusatz von bekannten Praealbuminmengen (s.Text).

Da bei agarelektrophoretischen Bestimmungen das PA im Hepatitisserum vermindert oder gar nicht vorhanden ist, könnte der Einwand erhoben werden, daß sich bei Hepatitisserum ein Proteinkomplex von langsamerer Wanderungsgeschwindigkeit bildet, der sich deshalb dem agarelektrophoretischen Nachweis entzieht. Um dieser Vermutung zu begegnen, wurden zu einem Normalserum und einem Hepatitisserum jeweils die gleichen Mengen PA-reinst-Lösung zugesetzt.

Bei der Durchführung dieser Untersuchungen wurden die bei der Agarelektrophorese angegebenen Volumina ange-

wandt. Die bei der Trübungsmessung vermuteten Störfaktoren wurden bei der Elektrophorese in Übereinstimmung mit unseren Versuchen nicht beobachtet. Hier wurden die zugesetzten PA-Mengen bei Normalserum und bei Hepatitisserum voll erfaßt, so daß auch das Vorliegen eines PA-Globulinkomplexes unwahrscheinlich ist.

Der Einfluß des Bilirubins auf die quantitative immunologische Bestimmung des PA zeigte sich besonders überzeugend bei der vergleichenden graphischen Darstellung verschiedener Verdünnungen von Normalseren und Hepatitisseren im gleichen Versuchsansatz.

Bei der Beschreibung der Ausführung der quantitativen immunologischen Untersuchungen wurde bereits darauf hingewiesen, daß für die Bestimmungen Verdünnungen von 1:10, 1:15 und 1:3 angesetzt wurden. Zur Veranschaulichung wurden in Abb. 18 A die Extinktionen der Trübungswerte und in Abb. 18 B die unter Berücksichtigung der verschiedenen Verdünnungen in mg% umgerechneten PA-Werte von 3 Normalseren und 3 Hepatitisseren aufgezeichnet.

Bei Normalseren wurden mit zunehmender Verdünnung niedrigere Extinktionen gemessen (Abb.18 A x-x), so daß nach Multiplikation mit der jeweiligen Serumverdünnung die in mg% umgerechneten PA-Größen übereinstimmen (Abb. 18 B x-x). Das Verhalten der Extinktionen bei Hepatitisseren ist in Abb.18 A o-o) vergleichsweise aufgetragen. Es zeigt bei den verschiedenen Verdünnungen keinen wesentlichen Unterschied, so daß die in mg% ermittelten PA-Werte der verschiedenen Verdünnungen große Diskrepanzen aufweisen, wobei die PA-Werte der größten Verdünnung höher liegen als die der Normalseren. Die niedrigeren Verdünnungen zeigen dementsprechend auch kleinere PA-Werte (Abb.18 B o-o). Daraus ließe sich der Schluß ziehen, daß die Antigen-Antikörperreaktion in den Verdünnungen 1:3 und 1:5 schon im Antigenüberschuß stattfindet und dadurch die geringeren Trübungswerte zu erklären wären (s.PA-Eichkurve I, Abb.9). Vergleichende Untersuchungen mit der Immunelektrophorese machen eine solche Deutung aber unwahrscheinlich. Diese Diskrepanz wird später diskutiert.

A

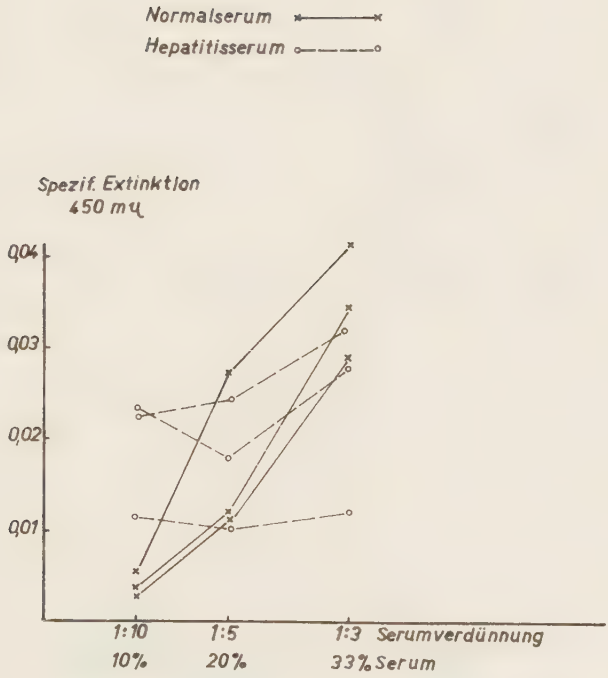


Abb. 18 zeigt in A die Extinktionen der Trübungswerte bei 450 mμ und in B (S.42) die Serum-PA-Werte in mg% von 3 Normalseren und 3 Hepatitisseren bei verschiedenen Verdünnungen.

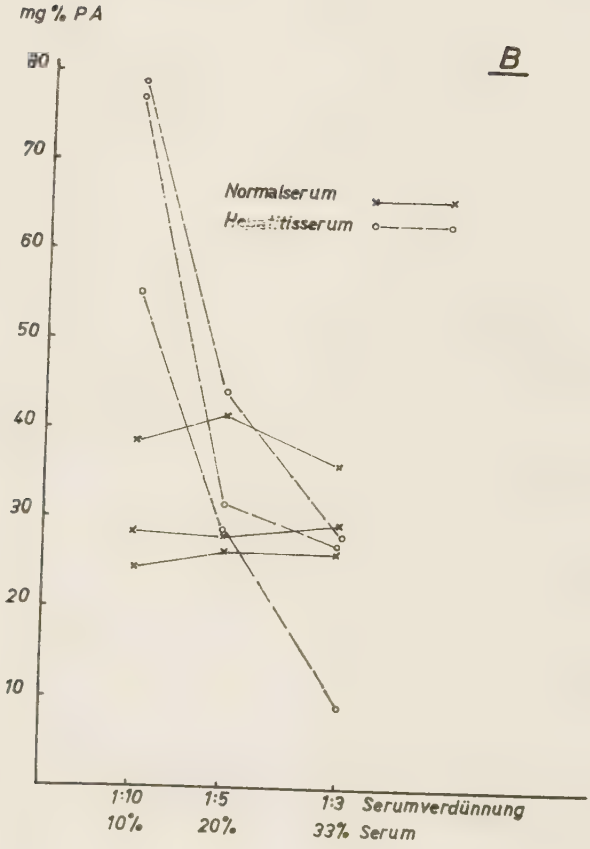

mg % PA
B
80
70
60
50
40
30
20
10
Normalserum
Hepatitisserum
1:10
10%
1:5
20%
1:3
33%
Serumverdünnung
Serum

Abb. 18 B.

Quantitative immunologische Bestimmung der PA-Konzentration von

a) Normalseren:

Entsprechend den methodischen Angaben von SCHULTZE und SCHWICK[53] wurden quantitative PA-Bestimmungen an 16 Seren gesunder Personen (12 Männer, 4 Frauen) durchgeführt. Das Serumeiweißbild wurde in jedem Fall kontrolliert und ist in Tab. 6 mit aufgeführt. Bei allen Untersuchungen wurden mindestens 2 verschiedene Verdünnungen doppelt bestimmt. Insgesamt kamen 3 Antiserumchargen zur Anwendung, für die jeweils eine neue Eichkurve angelegt werden mußte. Die agarelektrophoretischen Bestimmungen wurden mit 4 verschiedenen Agarchargen und 3 Farblösungen ausgeführt und die PA-Werte mittels der entsprechenden Faktoren in mg% umgerechnet. In Tab.6 sind die Mittelwerte der immunologischen und agarelektrophoretischen PA-Bestimmungen in mg%, zusammen mit den dazugehörigen Serumeiweißbildern, wiedergegeben.

Die Mittelwerte der immunologisch und agarlektrophoretisch bestimmten PA-Werte unterscheiden sich statistisch nicht. Die Differenz der Mittelwerte beträgt 1 mg% und die S-Werte beider Methoden liegen mit $\pm$ 7,4 und $\pm$ 5,2 in der gleichen Größenordnung. Wegen des nur begrenzt zur Verfügung stehenden Anti-PA-Serums wurden nur 16 Seren mit der immunologischen Methode untersucht und mit der Agarelektrophorese verglichen, zusätzlich wurden aber noch 54 Normalseren mit der elektrophoretischen Methode allein untersucht (s.S. 13).

Die Tabelle 6 zeigt die gute Übereinstimmung der Normalserumkollektive.

Tabelle 6.

Serum Nr.	mg% PA im Serum Immun.Best.	Elektr.Best.	G.E.	Serumeiweißbild Alb.	α 1	α 2	β	γ
1♂	28,0	28,0	7,8	58,0	5,0	7,8	12,3	16,9
2♀	20,9	27,0	7,0	56,4	5,1	8,0	11,4	19,1
3♀	28,0	33,0	7,2	60,3	5,0	6,5	10,1	18,1
4♂	29,0	32,7	7,4	61,2	4,0	8,0	10,7	16,1
5♀	30,0	28,5	7,4	55,0	4,9	8,7	10,2	21,2
6♂	15,0	25,2	7,1	56,6	4,1	7,3	12,0	20,0
7♀	27,5	32,5	7,2	57,9	4,8	6,6	10,9	19,7
8♂	43,2	34,1	8,0	56,5	3,7	8,7	13,5	17,6
9♂	29,7	32,6	7,6	56,4	5,4	7,6	11,4	19,2
10♂	37,4	34,9	7,6	56,6	5,7	7,5	13,1	17,1
11♂	37,6	36,1	7,9	62,3	4,1	7,3	11,1	15,2
12♂	18,7	15,4	7,4	57,7	5,0	8,4	12,1	16,8
13♂	29,4	32,8	7,4	62,4	4,9	7,7	10,5	14,5
14♂	32,4	37,3	7,5	60,3	5,4	6,4	10,2	17,7
15♂	37,7	32,6	7,7	56,5	3,6	5,1	13,4	21,4
16♂	37,5	34,6	7,0	54,8	5,0	8,0	12,2	20,0
Mittelwert:								
($\bar{x}$)	30,1	31,1						
N	16	16						
S	±7,4	±5,2						
N	32							
t	0,4							
p	< 0,70							

) PA-Bestimmungen an Hepatitisseren:

Der PA-Gehalt an Hepatitisseren wurde entsprechend dem vorher Gesagten ebenfalls mit verschiedenen Anti-PA-Serumchargen bestimmt. Ausgesucht wurden Seren mit unterschiedlichem Bilirubingehalt. Die Ergebnisse sind, zusammen mit der klinischen Diagnose und dem Bilirubingehalt in mg%, in Tabelle 7 aufgeführt. Die in mg% angegebenen PA-Werte setzen sich aus den Mittelwerten der 3 Verdünnungen (1:10, 1:5, 1:3) zusammen, die in Doppelbestimmungen gemessen wurden.

Die Zusammenstellung zeigt, daß bei Hepatitisseren die Mittelwerte der agarelektrophoretisch bestimmten PA-Werte signifikant niedriger liegen als die Mittelwerte der mit der immunologischen Methode bestimmten PA-Werte.

Bei einem Vergleich innerhalb einer der angewandten Methoden ergibt sich für die agarelektrophoretische Methode, daß die PA-Werte von Hepatitisseren signifikant niedriger liegen als die von Normalpersonen (Tab.8). Dieses Ergebnis wird mit der immunologischen Methode nicht wiedergegeben. Hier unterscheiden sich die immunologisch gefundenen Werte von Normalseren und Hepatitisseren nicht signifikant. Die Ursachen dieser Differenz werden in der Diskussion erörtert. In der Tab.8 werden für beide Methoden die Mittelwerte ($\bar{x}$), Anzahl der Einzelwerte (N) und die Standardabweichungen (S) der Mittelwerte für Normalseren und Hepatitisseren aufgeführt:

Tabelle 8.

	Agarelektrophoret.Bestimmung		Quant.immunol.Bestimmung	
	Normalseren	Hepatitisseren	Normalseren	Hepatitisseren
$\bar{x}$	31,1 mg%	10,1 mg%	30,1 mg%	24,9 mg%
N	16	8	16	8
S	±5,2	±6,2	±7,4	±9,0
N	24		24	
t	8,2		1,4	
p	< 0,001		< 0,20	

Tabelle 7.

Name	Krank. Bl.Nr.	Diagnose	Ges.Bilir.d.S. mg%	mg% PA im Serum Immun. Best.	mg% PA im Serum Elektr. Best.	Serumeiweißbild G.E.	Alb.	α_1	α_2	β	γ
Lu.	1959/1433	chron. Hepatitis	20,8	23,4	14,7	7,0	46,1	4,8	4,8	6,4	37,9
Kn.	1960/3305	cholestat. Hepatose	20,4	28,8	13,9	7,1	38,5	6,1	7,3	9,4	38,7
Mei.	1959/965	Serum-Hepatitis	7,6	30,0	13,2	7,1	36,7	6,8	7,2	9,4	39,9
Str.	1960/584	akute Hepatitis	29,0	0	0	7,1	51,5	4,5	4,9	11,9	27,2
Jö.	1960/1366	chron. Hepatitis	1,3	34,0	17,0	7,0	46,0	4,8	4,8	6,4	38,0
Wei.	1960/1842	Hepatitis	26,0	31,6	16,3	7,2	47,1	3,7	4,6	7,0	37,6
Rö.	1958/600	Virus-Hepatitis	16,4	22,0	3,0	7,2	48,1	4,4	6,6	10,2	30,7
Po.	1957/1519	"	27,0	29,7	3,0	7,9	50,3	4,0	7,0	9,0	29,7
Mittelwert:				$\bar{x}$ 24,9	10,1						
				N 8	8						
				S $\pm$9,0	$\pm$6,2						
				N 16							
				t 3,85							
				p < 0,002							

c) Vergleich der immunologischen und agarelektrophoretischen PA-Bestimmungen von Normalseren und Hepatitisseren sowie der entsprechenden Mischseren.

Die Bestimmungen wurden mit Ansätzen, die in den methodischen Kapiteln für die agarelektrophoretischen und immunologischen Untersuchungen beschrieben wurden, durchgeführt und die Ergebnisse in Tab. 9 wiedergegeben.

Tabelle 9.

Normalserum A		Hepatitisserum B		Normalserum + Hepatitisserum A + B, 1:1			
Immun. Best. mg%	Elektr. ~ mg%	Immun. Best. mg%	Elektr. ~ mg%	Immun. gemessen mg%	theor.	Elektroph. gemessen mg%	theor.
28,0	28,0	22,0	3,0	15,0	25,0	15,0	16,0
20,9	27,0	29,7	3,0	35,2	25,2	14,0	16,0
28,0	33,0	28,8	13,9	3,0	28,4	26,0	23,4
29,0	32,7	30,0	13,2	10,0	29,0	25,9	22,9
30,0	28,5	23,4	14,7	>48,0	26,7	17,4	21,6

Bei einem Vergleich der immunologischen und agarelektrophoretischen Bestimmungen zeigt sich bei den Normalseren eine gute Übereinstimmung der Werte. Bei den Hepatitisseren findet sich keinerlei Korrelation. Ihre mit der immunologischen Methode bestimmten Werte liegen im Bereich der Normalseren, während die agarelektrophoretisch ermittelten Werte gegenüber den Normalseren erniedrigte Werte ergeben. Bei den gemischten Seren zeigt ein Vergleich der immunologischen und agarelektrophoretischen Bestimmungen bis auf einen Fall große Diskrepanz. Die für jede Methode aus den beiden Ausgangsseren errechneten theoretischen Werte wurden durch die Bestimmungen der Agarelektrophorese bestätigt. Die Werte der immunologischen Methode sind theoretisch schwer erklärbar; sie liegen sowohl unter wie über den theoretisch zu erwartenden Ergebnissen.

d) PA-Bestimmungen an gealterten Seren.

Nachdem die agarelektrophoretischen Versuche bei gealterten Seren einen vergrößerten Vorläufer gezeigt hatten, soll durch immunologische Untersuchung geklärt werden, ob es sich hierbei um PA handelt, da von früheren Untersuchern immer wieder der Verdacht geäußert wurde, daß es sich bei dem PA lediglich um ein elektrophoretisch bedingtes Denaturationsprodukt handele. Die Fettfärbungen hatten schon gezeigt (s.S. 17), daß sicher auch andere Proteinkomplexe an der Bildung des Vorläufers bei Serumalterung beteiligt sind. Aus der Literatur sind Beobachtungen über lipoproteinhaltige Vorläufer bekannt, die zum Teil als α_1-Lipoprotein identifiziert wurden[6)8)54)]. Quantitative immunologische Vergleiche an frischen und (bei 20°C) gealterten Seren wurden bei 4 Normalseren und einem Hepatitisserum durchgeführt. Die Ergebnisse sind zusammen mit den agarelektrophoretisch gefundenen PA-Werten in Tab. 10 zusammengestellt.

Tabelle 10.

Serum	frisches Serum mg% PA Immunolog.	frisches Serum mg% PA Elektroph.	gealtertes Serum mg% PA Immunolog.	gealtertes Serum Alb.Vorläufer Elektroph.
Normalserum 1	28,0	32,5	37,4	62,5
" 2	26,9	30,0	41,8	69,2
" 3	42,9	34,1	33,0	52,1
" 4	43,4	39,9	41,2	86,4
Hepatitisserum	0	0	0	29,1
Mittelwert:	28,2	27,3	30,7	59,9

An 4 Versuchen mit Normalseren zeigt sich, daß das immunologisch nachweisbare PA nach Alterung des Serums nicht verwertbar ansteigt, während agarelektrophoretisch eine Vergrößerung der Vorfraktion zu verzeichnen ist (s.S. 17). Bei der Untersuchung von Hepatitisseren ließ

sich der gleiche Befund für die quantitative immunologische Bestimmung erheben. Zur besonderen Veranschaulichung wurde in Tab. 10 solch ein Hepatitisserum aufgeführt, in dem im frischen Zustand immunologisch und agarelektrophoretisch gar kein PA nachweisbar war. Bei dem gealterten Serum fand sich nur agarelektrophoretisch eine meßbare Fraktion, die mit Fett- und Eiweißfarbstoffen darzustellen war.

D. Immunelektrophoretische Untersuchungen.

a) PA-Bestimmungen an einem Normalserum und einem bilirubinhaltigem Serum.

Um dem Einwand zu begegnen, daß bei Hepatitisserum das Praealbumin, - das bei der quantitativen immunologischen Bestimmung normale Werte zeigt, mit der agaralektrophoretischen Methode dagegen vermindert oder gar nicht nachzuweisen ist -, einen Komplex mit einem anderen Protein eingeht, wurden Mikroimmunelektrophoresen nach SCHEIDEGGER von Normal- und Hepatitisserum durchgeführt (Abb. 19).

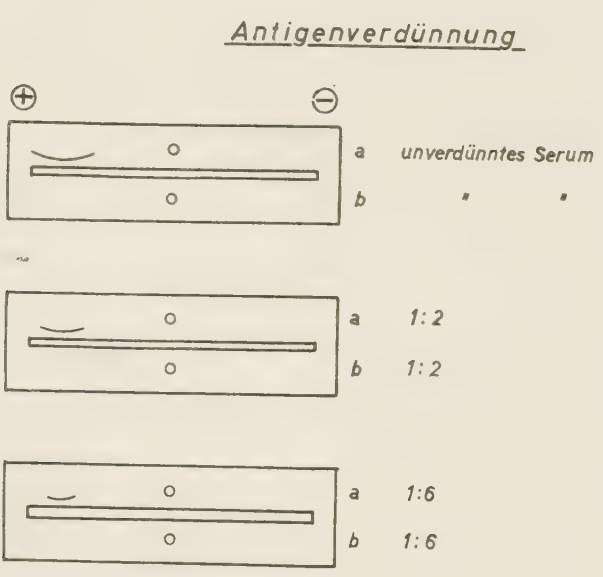
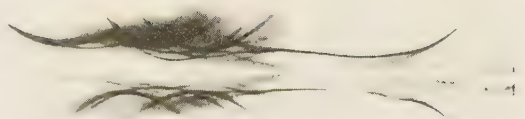


Abb. 19. Immunelektrophoresen von Normalserum und Hepatitisserum (Bilirubingehalt 20 mg%) bei verschiedenen Antigenverdünnungen.
Ansätze: 0,05 ml Antipraealbuminserum (Behringwerke)
2 λ Antigenverdünnung (100%,50%,16%).

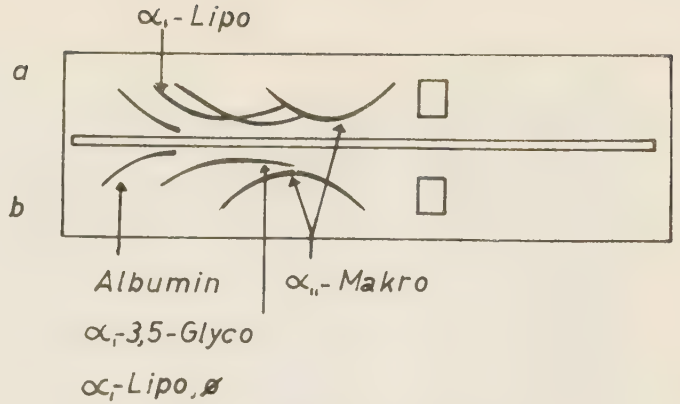
Die Immunelektrophoresen zeigen mit zunehmender Verdünnung des Normalserums eine Abschwächung der PA-Praecipitate. Im Hepatitisserum lassen sich dagegen bei keiner Verdünnung, weder vor dem Albumin noch im Bereich irgendeiner anderen Serumfraktion, Praealbuminpraecipitate nachweisen, so daß ein "Antigenüberschuß" auszuschließen ist.

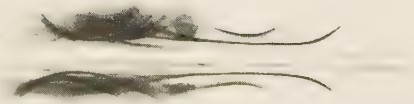
b) Immunelektrophoretische PA-Bestimmungen an frischen und gealterten Normalseren und Hepatitisseren.

Zur Klärung der zwischen der agarelektrophoretischen und immunologischen Methode auftretenden Diskrepanz bei der Bestimmung von frischen und gealterten Seren, zu der auf S. 48 schon Stellung genommen wurde, wurden Immunelektrophoresen mit Anti-Praealbumin-Serum (Behringwerke), Anti-Human-Serum (Institut Pasteur) und Anti-α_2-Makroglobulin-Serum (Behringwerke) hergestellt. Um in jedem Fall etwaige PA-Proteinkomplexe, die besonders bei Hepatitisserum auf Grund der quantitativen immunologischen Untersuchungen zu erwarten waren, aufzufinden, wurde bei allen immunelektrophoretischen Untersuchungen die PA-Anti-Serumrinne bis zum β-Bereich durchgezogen. Zur Veranschaulichung werden in Abb. 20 die Immunelektrophoresen eines frischen und gealterten Normalserums sowie eines frischen und gealterten Hepatitisserums mit Anti-Human-Serum wiedergegeben. Die gealterten Seren wurden 4 Wochen bei 20° C gelagert.



Normalserum





Hepatitisserum

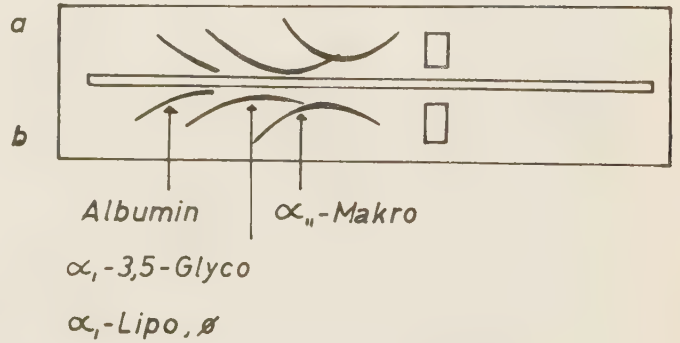


Abb. 20. Immunelektrophoresen eines frischen (a) und gealterten (b) Normalserums und Hepatitisserums. Antiserum: Anti-Human-Serum (Insitut Pasteur).

Der Vergleich der Immunelektrophoresen frischer und gealterter Normalseren und Hepatitisseren gestattet folgende Aussagen:

1. Das mit Anti-PA-Serum nachgewiesene PA ändert seine Wanderungsgeschwindigkeit nach Serumalterung nicht; die PA-Praecipitate sind auch nach Alterung nachweisbar.
2. Vor dem Albumin lassen sich bei den gealterten Seren außer dem oben schon beschriebenen PA mit dem Anti-Human-Serum (Institut Pasteur) keine Immunpraecipitate erfassen. Es ist deshalb nicht möglich, mittels der Immunelektrophorese eine Aussage über den agarelektrophoretisch nachgewiesenen Lipoproteinvorläufer zu machen.
3. In allen untersuchten Fällen läßt sich zeigen, daß das α_2-Makroglobulin sowohl bei den Hepatitisseren wie bei den Normalseren (Abb. 20) im gealterten Zustand schneller wandert. Es hat fast den Anschein, als ob auch das 3,5-Glycoprotein im gealterten Serum etwas schneller wandert, nur daß hier der Unterschied nicht so eindeutig ist. Das 3,5-Glucoprotein wurde durch sein typisches Praecipitat identifiziert, während die schnellere Wanderung des α_2-Makroglobulins durch Verwendung des spezifischen Antiserums (Anti-α_2-Makroblobulin-Serum vom Kaninchen, Behringwerke) zu erkennen ist.
4. Bei Normalserum ist das α_1-Lipoprotein nach Alterung nicht mehr nachweisbar. Das empfindliche Protein ist wahrscheinlich durch Lagerung zerstört worden und macht möglicherweise unter Verlust seiner antigenen Eigenschaften einen Teil der Lipoproteinfraktion vor dem Albumin aus. Bei Lagerung eines Normalserums bei 4°C über einen kürzeren Zeitraum ist das α_1-Lipoproteinpraecipitat in der Immunelektrophorese noch nachweisbar, es wandert aber vor das Albumin. Es bestehen also augenscheinlich Unterschiede zwischen dem nur kurze Zeit bei 4°C gealterten und dem 4 Wochen bei 20°C gelagerten Serum bezüglich des α_1-Lipoproteins.

5. Bei schweren Fällen von Hepatitis fehlt das α_1-Lipoprotein im frischen und gealterten Zustand. Die etwas schnellere Wanderung des 3,5-Glucoproteins und α_2-Makroglobulins findet sich auch hier. Mit Anti-PA-Serum ließen sich in frischen und gealterten Seren geringe PA-Praecipitate nachweisen, die sich in der Wanderungsgeschwindigkeit nicht unterscheiden. Es fällt noch auf, daß die β_2-Makroglobulinfraktion bei Hepatitisserum (Abb. 20) wesentlich stärker ausgeprägt ist als bei den untersuchten Normalseren (Abb. 20).

Diskussion:

Das Praealbumin im Serum wurde mittels Agarelektrophorese und einer immunologischen Bestimmungsmethode quantitativ untersucht. Die elektrophoretische Methode wurde zum Ausschluß übersehener Fehlerquellen einer genauen Prüfung unterzogen. Zur quantitativen Bestimmung einer Proteinfraktion mit der Elektrophorese müssen folgende Voraussetzungen gegeben sein:

1. Die Reproduzierbarkeit der Photometerwerte muß gewährleistet sein.
2. Die Anfärbbarkeit des Proteins muß konstant sein.
3. Der Anfärbbarkeitsfaktor des Proteins, d.h. Farbextinktion pro mg Protein, der unter den vorliegenden Versuchsbedingungen dem Quotienten aus Planimeterwert und mg Protein entspricht, muß ermittelt werden.
4. Die Beziehung zwischen Proteinkonzentration und Extinktion muß linear sein (Lambert Beer'sches Gesetz).

Diese Voraussetzungen wurden in der vorliegenden Arbeit auf folgende Weise erfüllt:

1. Die Konstanz des Photometers wurde zur Ausschaltung tageszeitlicher Stromschwankungen mit Standardstreifen gemessen und zur Kontrolle über einen längeren Zeitraum mit einem Eichkeil geprüft.
2. Die Konstanz der Anfärbbarkeit ist so wichtig, da keine relative sondern die absolute Messung des Praealbumins durchgeführt wird. Es wurde gefunden, daß die Anfärbbarkeit des Proteins auf dem Agar von der Art der verwandten Farbe[44)], dem Farbansatz und der Agarcharge abhängig war. 30 Färbungen lassen sich ohne Beeinträchtigungen der Farbeigenschaften mit einer Sublimat-Essigsäure-Amidoschwarz 10B-Farbe durchführen, sofern folgende Bedingungen streng eingehalten werden:
   a) Genaue Einhaltung der Färbe- und Entfärbebedingungen (Aufbewahrung der Farbe, Alter der Farbe, Streifenzahl und Entfärbeflüssigkeit).
   b) Kontrolle der Versuche mit Standardstreifen.

3. Der Korrekturfaktor zur Umrechnung der PA-Planimetereinheiten in mg% wurde für jede Agarcharge und jeden Farbansatz mit PA-Standardlösung bestimmt. Bei einer Gegenüberstellung von elektrophoretisch gelaufenen und nur diffundierten stationären Praealbumin- und Albuminstandardstreifen zeigen die PA-Streifen der Elektrophorese die konstantesten Werte.
4. Mit einer Eichkurve wurde die Proportionalität zwischen der Anfärbbarkeit des Praealbumins in Planimetereinheiten und der PA-Konzentration in mg/ml nachgeprüft. Die Kurve zeigt zwar keine strenge Linearität zwischen Protein in mg/ml und Planimetereinheit, doch ist die Abweichung im Bereich der Normalwerte so geringgradig, daß sie bei der Bestimmung von Normalseren vernachlässigt werden kann.

Nach strenger Einhaltung der eben diskutierten Bedingungen zeigen die vorliegenden Untersuchungen eine gute Übereinstimmung der mit der agarelektrophoretischen und immunologischen Methode ermittelten PA-Werte von Normalseren, aber Diskrepanzen der PA-Bestimmung bei Hepatitisseren.

Insgesamt wurden von 8 bilirubinhaltigen Seren immunologische PA-Bestimmungen durchgeführt. Das Ergebnis zeigt Werte, die dem PA-Gehalt von Normalseren entsprechen, während agarelektrophoretisch - in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen[6)7)47)] - ein stark erniedrigtes PA nachweisbar ist.
Wenn man annimmt, daß bei den immunologischen Untersuchungen ein Pipettierfehler im Hauptwert bzw. im Serumleerwert die unterschiedlichen Ergebnisse verursache, müßten sowohl hohe wie auch niedrige PA-Werte bei Hepatitisseren beobachtet werden. Das ist aber nicht der Fall. Es zeigt sich, daß von 8 Bestimmungen nur 2 Werte unter 20 mg% PA liegen. Würde man nur einen Pipettierfehler für die Diskrepanzen zwischen Elektrophorese und quantitativer immunologischer Bestimmung verantwortlich machen, so ist nicht einzusehen, warum nicht mehr niedrige Werte (verursacht durch falsche Leerwerte) oder gar negative Ausschläge des Photometers

registriert wurden. Gegen einen überzeugenden Einfluß eines Pipettierfehlers spricht auch die gute Übereinstimmung der Leerwerte in der Bilirubinverdünnungskurve (Abb. 15), die einmal im Originalansatz der immunologischen Bestimmungsmethode und einmal für 11 mal höhere Bilirubinverdünnungen getestet wurde.

Agarelektrophoretisch läßt sich bei den untersuchten bilirubinhaltigen Seren Leberkranker kein oder nur ein stark vermindertes PA nachweisen. Um diese Diskrepanz zu der immunologischen Bestimmung zu deuten, bietet sich folgende Erklärungsmöglichkeit an. Theoretisch wäre es denkbar, daß im Hepatitisserum das PA aus nicht näher bekannten Gründen nicht vor das Albumin wandert und so dem agarelektrophoretischen Nachweis entgeht. Es wäre z.B. möglich, daß das PA einen Komplex mit einem anderen Protein bildet. So wurde von TATA[55] behauptet, daß das thyroxinbindende Interalphaglobulin einen Komplex aus PA und einem unbekannten α-Globulin bildet. Die Untersuchungen konnten aber nicht bestätigt werden[8)21)]. HAVEZ und BIZERTE[29)] erwähnten auch einen PA-Komplex im β_2-A-Bereich, dessen Bestätigung noch aussteht. Um daher eine Veränderung oder Beeinflussung der PA-Wanderung in der Elektrophorese durch Hepatitisserum zu prüfen, wurden zwei Versuchsanordnungen durchgeführt:

1. Immunelektrophoretischer PA-Nachweis im Normalserum und Hepatitisserum.
2. Zugabe von PA-reinst-Lösung zu Normalserum und Hepatitisserum mit anschließender agarelektrophoretischer und immunologischer Kontrolle.

Die immunelektrophoretischen Untersuchungen zeigen, daß das PA nur vor dem Albumin nachzuweisen ist. Mit der agarelektrophoretischen Methode lassen sich die PA-Zugaben ebenfalls vor dem Albumin wiederfinden. Nach diesen Untersuchungen ist es unwahrscheinlich, daß die elektrophoretisch nachweisbare PA-Vermehrung durch die Bildung eines PA-Proteinkomplexes mit langsamer elektrophoretischer Beweglichkeit zustande kommt. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Befunden, bei denen mit ^{131}I-Thyroxin bela-

denes PA nach Immunpraecipitation nur vor dem Albumin in Kontaktautoradiographien nachgewiesen wurde[8)21)].
Auffällig ist, daß die immunologischen PA-Bestimmungen bilirubinhaltiger Seren gerade im Bereich der Werte von Normalseren liegen. Als Erklärungsmöglichkeit kann angenommen werden, daß es in den Versuchsanordnungen mit bilirubinhaltigen Seren und Antiserum zum Auftreten unspezifischer Trübungen kommt, die einen höheren PA-Wert vortäuschen können. Der Beweis, daß das Auftreten von unspezifischen Trübungen im Hepatitisserum höhere PA-Werte vortäuscht, kann mit Hilfe unserer Versuchsanordnungen nicht direkt geführt werden. Einen Einfluß bilirubinhaltigen Serums auf die quantitative immunologische Bestimmung machen die folgenden drei Versuchsanordnungen wahrscheinlich:

1. Vergleichende Untersuchungen von Mischseren, bei denen die PA-Werte der einzelnen Komponenten bekannt sind. Hier zeigt sich, daß der theoretisch zu erwartende PA-Wert bei Mischseren mit der Elektrophoresemethode im Bereich der Fehlerquelle wiedergefunden wird, während die quantitativen immunologischen Ergebnisse der Mischseren regellos ausfallen, d.h. wesentlich höhere und auch niedrigere Werte als theoretisch erwartet wurden zeigen.
2. Nach PA-Zugaben zu einem Normalserum und einem Hepatitisserum zeigen die quantitativen immunologischen Messungen, daß nur das zum Normalserum zugesetzte PA voll erfaßt wird, während das Ergebnis der PA-Zugabe zu Hepatitisserum willkürlich ausfällt, obwohl die gesamte PA-Konzentration sicher noch nicht im Antigenüberschuß liegt. Bei agarelektrophoretischer Kontrolle dieses Versuches findet sich das zu beiden Seren zugesetzte PA wieder.
3. Auffällig ist, daß bei verschiedenen Verdünnungen bilirubinhaltiger Seren (1:3, 1:5, 1:10) in der quantitativen immunologischen Bestimmung die höheren Bilirubinkonzentrationen kleinere PA-Werte ergeben (Abb.18 B). Dieser Befund könnte so interpretiert werden,daß die

PA-Konzentration im unverdünnten Hepatitisserum bereits im Antigenüberschuß, d.h. auf dem absteigenden Ast der Eichkurve liegt. Eine immunelektrophoretische Kontrolle der Versuche (Abb.19) spricht aber gegen eine solche Auffassung, da sich bei keiner Verdünnungsstufe des Hepatitisserums - im Gegensatz zum Normalserum - ein PA-Praecipitat nachweisen ließ, also ein Antigenüberschuß unwahrscheinlich ist. Im Kontrollversuch mit Normalserum fand sich in der quantitativen immunologischen Bestimmung und der Immunelektrophorese entsprechend der Verdünnung eine Abschwächung der PA-Praecipitate. Ein Vergleich der Abb.18 A und 18 B zeigt weiterhin sehr deutlich, daß bei Normalserum die spezifische Extinktion proportional zur Verdünnung ist, während bei Hepatitisseren die Höhe der Extinktion der spezifischen Trübung von der Serumverdünnung nur unwesentlich beeinflußt wird. Die PA-Werte der Normalseren in mg% bei verschiedenen Verdünnungsstufen stimmen dagegen gut überein. Dieser Versuch spricht mit Sicherheit für unspezifische Trübungseinflüsse bei quantitativen immunologischen Untersuchungen.

Die aufgeführten Punkte weisen auf Störungsfaktoren der quantitativen immunologischen Bestimmung bilirubinhaltiger Seren hin. Wenn auch in Kontrollversuchen der Pipettierfehler des Leerwertes (Phosphatpuffer und bilirubinhaltiges Serum) eine offenbar nicht so schwerwiegende Fehlerquelle darstellt, so muß doch auf jeden Fall auf die Relation von unspezifischer Trübung zu der nur mittels zweier Leerwerte zu bestimmenden spezifischen Trübung hingewiesen werden (Abb.16, S.37), da sowohl unspezifische Antiserum-Trübung als auch unspezifische Serumeigentrübung bei bilirubinhaltigen Seren größer sind als die spezifische Trübung.
Der Vergleich der quantitativen immunologischen und agarelektrophoretischen PA-Bestimmungen zeigt, daß wahrscheinlich bei der immunologischen PA-Bestimmung von Hepatitisseren nicht näher zu charakterisierende unspezifische Trübungen bei der Mischung mit Antiserum auftreten. In diesem Sinne sprechen auch die immunelektrophoretischen Vergleichsuntersuchungen.

Zur Diskussion stehen weiterhin die Einflüsse von Temperatur und Lagerung auf die PA-Größe.
Agarelektrophoresen von Normalseren und Hepatitisseren zeigen nach Lagerung bei 20°C eine vergrößerte Fraktion vor dem Albumin und das Auftreten eines zusätzlichen Vorläufers. Untersuchungen mit der quantitativen immunologischen Bestimmungsmethode ergeben keine Veränderungen gegenüber frischen Seren.
Die Anfärbbarkeit der agarelektrophoretisch gefundenen Vorläufer mit Fettfarbstoffen spricht dafür, daß es sich um lipoidhaltige Proteine handelt. Diese Annahme wird unterstützt durch immunelektrophoretische Untersuchungen: in gealterten Seren ist kein α_1-Lipoprotein mehr nachweisbar.

Die agarelektrophoretisch gefundenen Vorläufer sind im Hepatitisserum etwas kleiner als bei Normalserum. Eine Erklärung hierfür ergibt sich möglicherweise aus dem schon im frischen Hepatitisserum nicht mehr nachweisbaren α_1-Lipoprotein. Sicher sind aber Denaturationsprodukte des α_1-Lipoproteins für diese Fraktionen nicht allein verantwortlich.
In diesem Sinne sprechen auch Untersuchungen von LEDVINA und KELLEN[38], die einen Abfall der β-Lipoproteinkonzentration im menschlichen Serum nach Einfluß von Temperatur und Lagerung fanden. Ähnliche Veränderungen der Lipoproteinfraktionen zeigen Untersuchungen von KUNKEL und BEARN[35], BOYLE und MOORE[11]. Wir fanden zusätzlich einen Abfall der Fettsäuren bei allen bei 20°C gealterten Seren.

Möglicherweise ist auch die schnellere Wanderung des α_2-Makroglobulins in gealterten Seren für die elektrophoretisch gefundenen Vorläufer verantwortlich. Veränderungen an diesem großen Molekül lassen das Vorwandern kleinermolekularer Bruchstücke denkbar erscheinen.

Zusammenfassung:

Es wurden quantitative Untersuchungen des Praealbumins im Serum mit einer Agarelektrophorese und einer immunologischen Proteinbestimmungsmethode durchgeführt. In Voruntersuchungen wurde die Proteinanfärbbarkeit im Agargel und der Einfluß des Serumbilirubins auf die quantitative immunologische Trübungsmessung geprüft.

Zur quantitativen Bestimmung einer Proteinfraktion mit der Elektrophorese mußten folgende Voraussetzungen erfüllt werden:

1. Sicherung der Reproduzierbarkeit der Photometerwerte durch Eichung mit Meßkeil und Standardstreifen.
2. Kontrolle der Anfärbbarkeit des Proteins mit Standardstreifen für jede neue Agarcharge und Farblösung.
3. Bestimmung eines Korrekturfaktors zur Umrechnung der PA-PLEH in mg% PA.
4. Anlegung einer PA-Eichkurve, die keine strenge Proportionalität zwischen Extinktion und Proteinkonzentration zeigt. Die Abweichung ist so geringgradig, daß sie vernachlässigt werden kann und die Unterschiede zwischen immunologischer und elektrophoretischer PA-Bestimmung hierdurch nicht erklärt werden können.

Der Serum-PA-Wert beträgt auf Grund von Untersuchungen an 70 Normalpersonen (40 Männer und 30 Frauen) 30,0 mg% $\pm$ 7,44 S. Die Mittelwerte von Männern (31,9 mg%) und Frauen (27,5 mg%) unterscheiden sich nicht signifikant. Eine Abhängigkeit vom Alter oder Gewicht sowie eine Cyclusabhängigkeit bei Frauen ließen sich nicht nachweisen.

Untersuchungen über die Einflüsse von Temperatur und Lagerung auf die PA-Größe ergeben für Normalseren und Hepatitisseren nach Lagerung bei 20°C eine vergrößerte Fraktion vor dem Albumin und das Auftreten eines zusätzlichen Vorläufers. Fettfärbungen, photometrische, immunelektrophoretische Differenzierung und quantitative immunologische

Bestimmungen machen es unwahrscheinlich, daß diese Vergrößerung nach Lagerung und Temperatureinfluß durch tryptophanreiches Praealbumin bedingt ist.

Quantitative immunologische Untersuchungen an 16 Normalseren ergeben einen PA-Wert von 30,1 mg% ± 7,44 S.
Bei Normalseren stimmen elektrophoretische und immunologische Bestimmung gut überein. Die quantitative immunologische PA-Bestimmung ergibt bei bilirubinhaltigem Serum höhere Werte als die elektrophoretische Bestimmung.

	n	elektroph.Best.	immunolog.Best.
Normalserum	16	31,1	30,1
Hepatitisserum	8	10,1	24,9

Es wurde versucht, diese Abweichung aufzuklären.
Folgende Versuche sprechen für einen Einfluß bilirubinhaltigen Serums auf die quantitative immunologische PA-Bestimmung:

1. Das Bilirubinmaximum liegt bei pH 7,5 in dem für die Trübungsmessung optimalen Wellenlängenbereich von 450 mμ.
2. Die unspezifische Eigentrübung des bilirubinhaltigen Serums ist im Verhältnis zur spezifischen Trübung unverhältnismäßig groß.
3. Zugesetztes Praealbumin läßt sich im Hepatitisserum nur ungenau wiederfinden, wohl aber im Normalserum und in agarelektrophoretischen Kontrollversuchen von Normalserum und Hepatitisserum.
4. Ergebnisse von Mischversuchen bekannter Ausgangsseren (Normalserum und Hepatitisserum, 1:1 gemischt) fallen bei Messungen mit der quantitativen immunologischen Methode willkürlich aus, während die agarelektrophoretischen Kontrollen den aus den Ausgangsseren errechneten Werten entsprechen.
5. Die spezifischen Extinktionen von Hepatitisserum zeigen nicht die bei Normalseren gefundene Proportionalität zur Verdünnung.

Immunelektrophoresen gealterter Seren zeigen ein schneller wanderndes α_2-Makroglobulin. Das α_1-Lipoprotein ist nicht mehr nachweisbar.

Ein Zusammenhang dieser Befunde mit dem vergrößerten Vorläufer wird diskutiert. Es handelt sich möglicherweise um schneller wandernde Proteinbruchstücke oder Lipoproteine. Die bei schweren Leberparenchymschäden gefundene starke Verminderung des tryptophanreichen Praealbumins wird durch diese Untersuchungen bestätigt.

Literaturverzeichnis

1. Aly, F.W.: Biochem.Z. 325,505-514 (1954)
2. Aly, F.W.: Verh.dtsch.Ges.inn.Med., 61.Kongr. (1955) 284-287
3. Aly, F.W.: 5.Kongr.Europ.Ges.f.Haemat.Freiburg (1955) 347-349, Berlin: Springer 1956
4. Aly, F.W.: Verh.dtsch.Ges.inn.Med., 63.Kongr. (1957) 689-695
5. Aly, F.W.: 6.Kongr.Europ.Ges.f.Haemat.Kopenhagen (1957) 65-71, Basel: Karger 1958
6. Aly, F.W., H.Niederhellmann: Klin.Wschr. 36,954-959 (1958)
7. Aly, F.W., H.Schaupp: Clin.Chimica Acta, Vol.4,88-95(1959)
8. Aly, F.W., K.H.Gillich: Prot.of Biol.Fluids, Proc. 8th Coll., Bruges 1960,152-158, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1961
9. Boyden, A., R.De Falco: Physiol.Zool. 16,229 (1943)
10. Boyden, A., K.Bolton, D.Gemeroy: J.Immunol. 57,211-227 (1947)
11. Boyle, E.R., V.Moore: J.Lab.clin.Med. 53,272 (1959)
12. Brendstrup, P.: Scand. J.clin.Lab.Invest. 5,312 (1953)
13. Burtin, P., J.J.Podicalo: Presse med. 62,1072 (1954)
14. Davies, G., B.Levin, V.G.Oberholzer: J.clin.Path. 5,312 (1952)
15. Dietrich, F.: Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 302,227 (1955)
16. Documenta Geigy: Wiss.Tab. (1955)
17. Eggstein, M., H.Hundeshagen: Klin.Wschr. 33,14 (1955)
18. Eggstein, M.: Sonderheft d.Z.f.Ernährungswissenschaft "Nahrungsfette u.Atherosklerose", Pallas Verlag, Cochheim, München 1961
19. Eggstein, M.: "The Blood Liquids and the Clearing Factor" 150-163 (1956) Verlag: Königl.Belg.Academ.d.Wiss.

20. Fisk, A.A., A.Chanutin, W.O.Klingmann: Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 78,1 (1951)

21. Gillich, K.H., F.W. Aly: Verh.dtsch.Ges.inn.Med., 66.Kongr. 711-716 (1960)

22. Grabar, P., C.A.Williams: Biochem.biophysica Acta (Amsterdam) 10,193 (1953)

23. Grabar, P.: Arch.Sci.biol.(Bologna) 39,589-592 (1955)

24. Grabar, P.,P.Burtin: "Analyse Immuno-Electrophoretique", Verlag: Masson & Cie., Paris (1960)

25. Grassmann, W.: Ber.ges.Physiol. 139,220 (1950)

26. Grassmann, W., K.Hannig: Z.phys.Chem. 1,290 (1952)

27. Gries, G.,F.W.Aly, H.F.v.Oldenshausen: Klin.Wschr. 31,644 (1953)

28. Gross, P.,H.Weicker: Klin.Wschr. 32,509 (1954)

29. Havez u.Bizerte: zit.n. Creyssel, R., J.M.Fine: Transfusion 2,2 (1959)

30. Heidelberger, M., F.E.Kendall: J.ef Exper.Med. 55,555 (1932)

31. Hoch, H., A.Chanutin: Proc.Soc.Exper.Biol.a.Med. 81,621 (1952)

32. Hoch, H., A.Chanutin: J.biol.Chem. 200,241-249 (1953)

33. Kabat, E.A.,Landew, D.H.Moore: J.clin.Invest. 21,571-577 (1942)

34. Kabat, E.A., M.M.Mayer: "Experimental Immunochemistry" (1948) Charles C.Thomas Publisher, Springfield,Ill., USA

35. Kunkel, H.G., A.G.Bearn: Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 86,887 (1954)

36. Larson, D.L., R.Feinberg: Science 120,426-427 (1954)

37. Laurell, G.B.: Acta physiol.Scand. 14,Suppl.46(1947)

38. Ledvina, M.,J.Kellen: Klin.Wschr. 40,916-917 (1962)

39. Lewin, J.: Int.Soc.of Blood Transf.Bibl.haemat. (Basel) 7,388-389 (1956)

40. Lewin, J.,J.Ghata, E.Azérad: Presse méd. 64,1433 (1956)

41. Lewin, J., E.Azérad,J.Ghata: Int.Conference on Biochem. Problems of Liquids, Oxford (1957)

42. Libby, R.L.: J.Immunol.34,71-73 (1938)

43. Matzelt, D.: Diss. Hamburg (1952)

44. Niemann, M.: Diss. Marburg/Lahn (unveröffentl.)

45. Pope, C.G.,M.Healey: Brit J.exp.Path. 19,397-410 (1938)

46. Riva, G.: "Das Serumeiweißbild" 308 (1957), Verlag: Huber, Bern u.Stuttgart

47. Schaupp, H.: Diss. Marburg/Lahn (1958)

48. Scheid, K.F., L.Scheid: Arch.Psychiatr.Nervenkr. 117,219 (1944)

49. Scheiffarth, F., G.Berg: Klin.Wschr. 34,134 (1956)

50. Schettler, G., M.Eggstein, F.Dietrich: Klin.Wschr. 34,684-688 (1956)

51. Schultze, H.E., M.Schönenberger, G.Schwick: Biochem.Z. 328,267-284 (1956)

52. Schultze, H.E., K.Heide, H.Müller: Behringwerk-Mitteilungen 32,1-24 (1957)

53. Schultze, H.E., G.Schwick: Prot.of Biol.Fluids, Proc. 6th Coll., Bruges 1958,15-25, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1959

54. Schwick, G.: Persönl. Mitteilung

55. Tata, J.R.: Biochem.J. 72,214 und 222 (1959)

56. Wiegand, I.: Diss. Marburg/Lahn (1961)

57. Wieme, R.J.: "Studies on Agar Gel Elektrophoresis", Verlag: Arscia Uitgaven N.V., Brüssel (1959)

Lebenslauf

Am 20.11.1934 wurde ich als Tochter des Bauingenieurs Bruno Schöttler und seiner Ehefrau Britta, geb. Laue, in Berlin geboren.
Von Herbst 1941 bis Ostern 1946 besuchte ich infolge von Evakuierungen Volksschulen in Berlin, Oberstaufen i.Allgäu, Rangsdorf Kr.Teltow, Roßlau/Elbe und Duisburg. Ostern 1946 wurde ich in die Frau Rat Goethe-Schule in Duisburg, ein städtisches Mädchengymnasium, eingeschult. Von dieser Schule wurde ich von August 1951 bis September 1952 beurlaubt, da ich ein einjähriges Stipendium an der Washington High School in Milwaukee, Wis., USA erhalten hatte. Am 13.6.1952 machte ich dort das amerikanische Abitur, und am 22.6.1954 legte ich eine externe Reifeprüfung an der Elisabethschule in Marburg ab.
Im Sommersemester 1955 immatrikulierte ich mich an der Philipps-Universität Marburg/Lahn für Geisteswissenschaften und im Wintersemester 1955/56 begann ich in Marburg das Medizinstudium. Am 30.4.1958 bestand ich hier die ärztliche Vorprüfung und am 21.9.1961 das medizinische Staatsexamen. Danach arbeitete ich 10 Monate als Medizinalassistentin am Anatomischen Institut in Marburg, Abteilung Prof.Dr.med. G.Petry, und 6 Monate in der Medizinischen Klinik Marburg.

Herrn Professor Dr. med. H.E. Bock danke ich für die Überlassung des Themas und der Arbeitsmöglichkeiten an seiner Klinik.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. F.W. Aly für die Anleitung und Ratschläge bei der Durchführung der Arbeit.